EINFLUSS VON N-ACETYL-L-CYSTEIN AUF DIE INSULINSEKRETION DER RATTE

DISSERTATION
zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften

der Fakultät für Chemie und Pharmazie
der Eberhard - Karls - Universität zu Tübingen

vorgelegt von
RAINER F. BRACKERTZ
aus Berlin

1984

EINFLUSS VON N-ACETYL-L-CYSTEIN AUF DIE INSULINSEKRETION DER RATTE

DISSERTATION
zur Erlangung des Grades eines Doktors
der Naturwissenschaften

der Fakultät für Chemie und Pharmazie
der Eberhard - Karls - Universität zu Tübingen

vorgelegt von
RAINER F. BRACKERTZ
aus Berlin

1984

Tag der mündlichen Prüfung: 16. Juli 1984

Dekan: Prof. Dr. J. Strähle

1. Berichterstatter: Prof. Dr. H. P. T. Ammon
2. Berichterstatter: Prof. Dr. E. Reinhard

Meinen Eltern
in Dankbarkeit
gewidmet

Die vorliegende Arbeit wurde im Januar 1981 unter Anleitung von Herrn Prof. Dr. H.P.T. Ammon am Pharmazeutischen Institut der Universität Tübingen begonnen und im Oktober 1983 abgeschlossen.

Herrn Prof. Dr. H.P.T. Ammon
danke ich für die Überlassung des Themas, seine freundliche Unterstützung und sein stetes Interesse am Fortgang dieser Arbeit.

Herrn Dr. M.C.M. Melien danke ich für die gute Zusammenarbeit und seine stete Hilfsbereitschaft.

Weiter gilt mein herzlicher Dank allen Mitgliedern des Arbeitskreises von Prof. Ammon für die ständige Diskussionsbereitschaft und die gute Zusammenarbeit.

ABKÜRZUNGEN

cAMP	cyclisches Adenosin-3':5'-monophosphat
AUC	Fläche unter der Kurve
BSA	Rinderserumalbumin
C	Celsius
pCMBS	para-Chloromercuribenzolsulfonsäure
CPDS	Bis-(5-carboxy-2-pyridyl)disulfid
Δ (Delta)	Differenz
DTNB	5,5'-Dithio-bis-(2-nitrobenzoesäure)
E	Einheiten
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
GSH	Glutathion, reduziert
GSSG	Glutathion, oxidiert
IRI	Immunoreaktives Insulin
i.v.	intravenös
kg	Körpergewicht
M	molar
min (')	Minuten
NAC	N-Acetyl-L-Cystein
NAD	Nicotinamid-adenin-dinucleotid
NADH	Nicotinamid-adenin-dinucleotid, reduziert
NADP(+)	Nicotinamid-adenin-dinucleotidphosphat
NADPH	Nicotinamid-adenin-dinucleotidphosphat, reduziert
n.s.	nicht signifikant

p	Probability
RIA	Radioimmunoassay
SEM	Standard error of the mean
U	Einheiten
Upm	Umdrehungen pro Minute
USP	United States Pharmacopeia

INHALTSVERZEICHNIS

		Seite
1	EINLEITUNG	1
1.1	Stand der Forschung	1
1.1.1	Mechanismus der Glucose-induzierten Insulin-Sekretion	1
1.1.2	Thiole und Insulinsekretion	3
1.1.2.1	Bedeutung der Zell-Thiole für die Insulin-Sekretion	3
1.1.2.2	Exogene Thiole und Insulinsekretion	7
1.1.3	Aminosäuren und Insulinsekretion	9
1.1.4	N-Acetyl-L-Cystein	13
1.2	Fragestellung	20
2	MATERIAL	21
2.1	Versuchstiere	21
2.2	Geräte	21
2.3	Chemikalien und Enzyme	22
2.4	Pufferlösungen	23
3	METHODEN	25
3.1	Durchführung der Tierversuche	25
3.1.1	Präparation der Versuchstiere	25
3.1.2	Versuche zur Pharmakokinetik des N-Acetyl-L-Cystein	27
3.1.2.1	Applikation	27

3.1.2.2	Abnahme der Blutproben	27
3.1.3	Intravenöser Glucose-Belastungstest	28
3.1.3.1	Applikation	28
3.1.3.2	Abnahme der Blutproben bei alleiniger Bestimmung der Blutglucose	29
3.1.3.3	Abnahme der Blutproben zur Bestimmung der Blutglucose und des Plasma-Insulin-Gehalts	29
3.1.3.4	Abnahme der Blutproben zur Bestimmung der Blutglucose, des Plasma-Insulin-Gehalts sowie der Konzentration löslicher Thiole, proteingebundener Thiole und des Gesamt-Thiolgehaltes im Plasma	30
3.2	Bestimmung der Konzentration löslicher Thiole und des Gesamt-Thiolgehaltes im Plasma	31
3.2.1	Auswahl der Methode	31
3.2.2	Beschreibung der Methode	33
3.2.3	Empfindlichkeit der Methode	33
3.2.4	Aufarbeitung der Blutproben für die Bestimmung der löslichen Thiole und des Gesamt-Thiolgehaltes	34
3.2.4.1	Fehlerquellen	34
3.2.4.2	Aufarbeitung der Blutproben zur Bestimmung des Gesamt-Thiolgehaltes	34
3.2.4.3	Aufarbeitung der Blutproben zur Bestimmung der Konzentration löslicher Thiole	35
3.2.5	Durchführung der Messung	35
3.2.6	Berechnung der proteingebundenen Thiole und Auswertung	37
3.3	Bestimmung der Plasma-Glucose	37
3.3.1	Methode	37
3.3.2	Durchführung der Bestimmung	38
3.4	Insulinbestimmung	38
3.4.1	Eichkurven	38

3.4.1.1	Erstellung der Eichkurven	38
3.4.1.2	Einfluß von N-Acetyl-L-Cystein auf den Verlauf der Eichkurven	39
3.4.2	Durchführung der Bestimmung	39
3.4.3	Berechnung der Insulinwerte	41
3.5	Versuchsauswertung	41
4	ERGEBNISSE	43
4.1	Pharmakokinetik von N-Acetyl-L-Cystein	43
4.1.1	Thiol-Plasmaspiegel nach alleiniger Gabe von N-Acetyl-L-Cystein	43
4.1.2	Thiol-Plasmaspiegel nach Gabe von N-Acetyl-L-Cystein (0,1 mmol/kg) und Glucose	51
4.2	Einfluß von N-Acetyl-L-Cystein auf das Plasma-Insulin und die Insulin-Freisetzung bei Glucose-Belastung	56
4.3	Einfluß von N-Acetyl-L-Cystein auf die Plasma-Glucose	72
4.3.1	Einfluß von N-Acetyl-L-Cystein auf die Plasma-Glucose bei Gabe von 250 mg Glucose/kg	72
4.3.2	Einfluß von N-Acetyl-L-Cystein auf die Plasma-Glucose bei Gabe von 500 mg Glucose/kg	76
5	DISKUSSION	89
5.1	Intravenös verabreichtes N-Acetyl-L-Cystein und Plasma-Thiole	89
5.2	Insulinotrope Wirkungen	93
5.2.1	Insulinfreisetzung durch Thiole	93
5.2.2	Insulinfreisetzung durch Aminosäuren	94
5.2.3	Insulinfreisetzung durch N-Acetyl-L-Cystein	96
5.3	N-Acetyl-L-Cystein und Plasma-Glucose	101

5.3.1	Effekte auf die Glucose-Elimination nach 250 mg Glucose/kg	101
5.3.2	Effekte auf die Glucose-Elimination nach 500 mg Glucose/kg	101
6	ZUSAMMENFASSUNG	105
6.1	Fragestellung	105
6.2	Ergebnisse	105
6.3	Schlußfolgerungen	106
7	LITERATURVERZEICHNIS	107

1. EINLEITUNG

1.1 Stand der Forschung

1.1.1 Mechanismus der Glucose - induzierten Insulin - Sekretion

Der gegenwärtige Kenntnisstand zum Mechanismus der durch Glucose induzierten Insulinsekretion wurde von verschiedenen Autoren zusammengefaßt, darunter von Ashcroft (1980) und von Howell und Tyhurst (1982). Danach führt Glucose über ihren Metabolismus zu einer Zunahme der Calciumionen-Konzentration im Cytoplasma. Durch das an Calmodulin gebundene Calcium kommt es dann einerseits zur Phosphorylierung von Protein, andererseits zeigt sich eine Wirkung auf Mikrofilamente und auf das Mikrotubulussystem. Als Ergebnis des Zusammenwirkens dieser Mechanismen findet dann die Sekretion (Granulawanderung und Exocytose) von Insulin statt (Abbildung 1). Glucose und bestimmte Hormone (darunter Glucagon) bewirken aber nicht nur Veränderungen im Glucosestoffwechsel, sondern auch eine Zunahme von cAMP in der Beta-Zelle, die ihrerseits über Proteinphosphorylierung und Calciumtranslokation zur Sekretion beiträgt (Brisson et al., 1972; Hellman et al., 1981; Sugden und Ashcroft, 1978). Dabei ist an der Langerhansschen Insel der Ratte die glucoseinduzierte cAMP-Bildung vom Redoxzustand der Insel-Thiole abhängig (Ammon et al., 1982) und kann durch reduziertes Glutathion (GSH) noch erhöht werden (Abdel Hamid, 1983). Die Zusammenhänge zwischen gesteigerter Glucosekonzentration und Erhöhung der Calcium-Konzentration im Cytoplasma stellt man sich so vor, daß a) der verstärkte Glucoseumsatz zu einem erhöhten Spiegel reduzierter Pyridinnukleotide (NADPH/NADP) mit der Folge einer Hemmung des Kaliumausstroms führt. Dies bewirkt eine Depolarisation und Permeabilitätsänderung der Cytoplasmamembran, was zu einem verstärkten Calcium-Influx über den

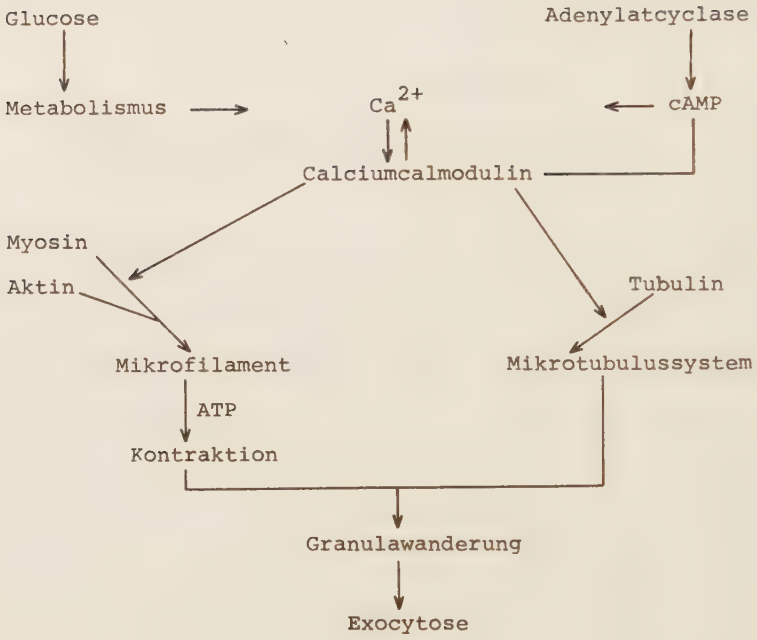


Abb. 1: Übersicht über den Ablauf des Insulinfreisetzungsmechanismus nach Howell und Tyhurst (1982)

voltabhängigen Calciumkanal führt.
b) über die Erhöhung des Phosphoenolpyruvats die mitochondriale Calciumaufnahme gehemmt wird (Ashcroft, 1980; Henquin, 1980).
Die große Bedeutung des NADPH/NADP-Quotienten für die durch Glucose induzierte Insulinsekretion konnte in den 70er Jahren durch die Untersuchungen der Arbeitsgruppen um Ammon (Ammon, 1973 a; Ammon et al., 1977 & 1979 a/b; Ammon und Verspohl, 1976 & 1979) und Malaisse (Malaisse et al., 1979 a/b) nachgewiesen werden. Die globale Bedeutung des NADPH im Zellstoffwechsel macht es allerdings wenig wahrscheinlich, daß die Verbindung ohne weitere Mittlerstufen den Calciumausstrom reguliert. Da NADPH auch Äquivalente für die Reduktion von oxidiertem Glutathion (GSSG) liefert und die Senkung des intrazellulären reduzierten Glutathion (GSH) durch Diamid (Niklas, 1978) oder Diazodicarbonsäure-bis-(N'-methylpiperazid) (Eujen, 1979) zu einer verminderten Insulinsekretion und zu einer dosisabhängig verminderten Calciumaufnahme (Hägele, 1981) führt, kann nicht ausgeschlossen werden, daß die Funktion von NADPH bei der glucoseinduzierten Insulinsekretion im Zusammenhang mit dem Glutathion-System steht (Ammon et al., 1980).

1.1.2 Thiole und Insulinsekretion

1.1.2.1 Bedeutung der Zell - Thiole für die Insulin - Sekretion

Die Zusammenhänge zwischen der Freisetzung von Polypeptidhormonen (u.a. Insulin) und dem Funktionszustand von Zell-Thiolen, vor allem der Membranthiole und des Glutathion-Systems, sind bereits vielfach diskutiert worden. So konnte gezeigt werden, daß SH-Reagenzien an der isolierten Neurohypophyse zur Sekretion von Vasopressin (Douglas et al., 1965) und an der Adenohypophyse des Rindes zur Sekretion von

somatotropem Hormon führen (Schofield, 1971). Ebenfalls mit SH-Reagenzien konnte die Insulinfreisetzung aus den isolierten Sekretionsgranula von Fischinseln gesteigert werden (Watkins und Moore, 1974). Auch an der isolierten Pankreasinsel der Dickmaus (Bloom et al., 1972; Hellman et al., 1973 a/b, 1974 & 1976) und an Hamsterinsulinomzellen (Erlichman et al., 1979) konnte mit derartigen Substanzen (z.B. p-Chloromercuribenzoat, Iodacetamid und 6,6'-Dithiodinicotinsäure) die Insulinsekretion erhöht werden. Es fehlen zwar noch entscheidende Kenntnisse auf molekularbiologischer Basis darüber, welche Rolle den entsprechenden Membranthiolen bei der Freisetzung von Insulin zukommt,doch hat die Forschung der 70er Jahre weitergehende Erkenntnisse zu mehreren Arbeitstheorien auf diesem Gebiet erbracht.

Wird an der Beta-Zelle ein Glucose-Rezeptor vorausgesetzt, so wäre es denkbar, daß die Glucose mit Membran-SH-Gruppen reagiert, die in Verbindung mit dem Rezeptor stehen, und auf diese Weise die Insulinfreisetzung bewirkt wird. Anhaltspunkte dafür ergeben sich daraus, daß man Membran-Thiolgruppen mit Hilfe von Disulfiden wie 5,5'-Dithio-bis-(2-nitrobenzoesäure)(DTNB) und Bis-(5-carboxy-2-pyridyl) disulfid (CPDS) oxidieren kann und damit eine Insulinsekretion erreicht (Grasetti, 1969; Grasetti und Murray, 1970), desgleichen durch Mercaptid-Bildung mit p-Chloromercuribenzolsulfonsäure (pCMBS) oder p-Chloromercuribenzoat (Hellman et al., 1974; Bloom et al., 1972; Ammon et al., 1977; Erlichman et al., 1979). Wie aus den letztgenannten Arbeiten von Hellman und Erlichman hervorgeht, ist diese Wirkung unabhängig von einem gesteigerten Glucoseabbau. Schließlich führt auch Jodacetamid als alkylierende Substanz zu einer erhöhten Freisetzung von Insulin, die aber von einer Freisetzungs-Hemmung gefolgt ist. Dies soll durch das Eindringen der Substanz in die Beta-Zelle und eine Verminderung der Glucose-Oxidation bedingt sein (Hellman et al., 1974).

Nachdem Matschinsky und Ellerman (1968) festgestellt haben, daß für die glucoseinduzierte Insulinsekretion eine Verstoffwechselung von Glucose erfolgen muß, ergibt sich mit der Untersuchung von möglichen Verbindungen zwischen Glucosestoffwechsel und Thiolgruppen der Membran ein weiterer Forschungsansatz. In diesem Zusammenhang konnte Ammon (1973 b) zeigen, daß die Stimulierung der Insulinsekretion durch Tolbutamid von der gleichzeitigen Anwesenheit von Glucose abhängig ist und die Substanz bei Glucoseentzug nicht mehr wirkt. Außerdem wurde die Aufmerksamkeit auf die reduzierten Pyridinnukleotide gelenkt, weil deren Erhöhung bei Induktion der Insulinfreisetzung durch Glucose, -Ketoisocapronsäure oder L-Leucin (Panten et al., 1973 & 1974) auf eine Verbindung mit dem Glucoseabbau schließen läßt. Andererseits läßt sich auch eine Erniedrigung der reduzierten Pyridinnukleotide erreichen, wenn man die Insulinsekretion durch Methylenblau (Ammon et al., 1977), NH_4^+ (Sener et al., 1978 a) oder Menadion (Malaisse et al., 1978) hemmt. Da diese reduzierten Nukleotide aber sowohl aus dem NADH/NAD- wie aus dem NADPH/NADP-Redoxsystem stammen, wurde eine Differenzierung nach Veech und Mitarbeitern (1969) vorgenommen (Bestimmung der Substratmenge und des Produktes nach Einwirkung einer nukleotidkatalysierten Dehydrogenase sowie der entsprechenden Quotienten der Pyridinnukleotide). Daraus ergab sich, daß eine Erhöhung der Glucosekonzentration von 2 auf 20 mM den NADPH/NADP-Quotienten erheblich stärker ansteigen läßt als das Verhältnis der Gesamt-Nukleotide. Von daher kann man auf eine große Bedeutung des NADPH/NADP-Redoxsystems für die durch Glucose bewirkte Insulinfreisetzung schließen (Ammon und Verspohl, 1976; Ashcroft, 1980; Malaisse et al., 1979 a; Sener at al., 1978 b). Da das NADPH bei der Metabolisierung der Glucose im Pentosephosphatshunt entsteht und dessen Aktivität mit Erhöhung der Glucosekonzentration gesteigert wird, soll auch diesem Metabolisierungsweg der Glucose dabei eine besondere Funktion zukommen (Verspohl et al., 1979).

Die Untersuchung des Glutathion-Systems und seiner Bedeutung für die Insulinsekretion schließlich ist u.a. aufgrund seiner Verbindungen zum NADPH/NADP-System von Interesse. Das NADPH besitzt wichtige Funktionen bei der Erhaltung des intrazellulären Redoxstatus, darunter fällt auch seine Bedeutung als Cosubstrat der Glutathionreduktase, die GSSG zu GSH reduziert. Vom intrazellulären Quotienten dieser beiden Verbindungen kann beispielsweise ein Einfluß auf den Redoxzustand von Membran-Thiolen in Organen ausgehen (Rink, 1974). Auch im Zusammenhang mit den Fragen, die sich zum Mechanismus der Insulinsekretion stellen, ist der GSH/GSSG-Quotient stärker in den Vordergrund gerückt, nachdem festgestellt wurde, daß Glucose zu einer Erhöhung des Quotienten führt (Ammon et al., 1978; Anjaneyulu et al., 1982), während der Quotient durch Methylenblau (dosisabhängig) und Diamid gesenkt werden kann (Ammon et al., 1979 a). Diamid ist ebenfalls in der Lage, die durch Glucose und p-Chloromercuribenzoat (Ammon et al., 1977) sowie die durch Glucose in Kombination mit Tolbutamid, Arginin, Leucin oder Aminophyllin (Niklas, 1978) induzierte Insulinsekretion herabzusetzen. Auch mit Diazodicarbonsäure-bis-(N'-methylpiperazid), einer dem Diamid chemisch verwandten Verbindung mit gleichem Wirkungsmechanismus, kann eine Senkung des GSH/GSSG-Quotienten und eine Hemmung der glucoseinduzierten Insulinfreisetzung erreicht werden; dies gilt nicht für das nicht membrangängige Dijodsalz der Substanz (Eujen, 1979).

Wird exogenes Insulin eingesetzt, so läßt sich der NADPH/NADP-Quotient herabsetzen (Ammon und Verspohl, 1976) und die durch Glucose, Glucose/p-Chloromercuribenzoat und Glucose/Tolbutamid hervorgerufene Insulinfreisetzung hemmen (Ammon et al., 1980). Dasselbe gilt für die Insulinsekretion nach Glucose/Arginin und Glucose/Leucin (Händel, 1978; Verspohl et al., 1981). Schließlich führt exogenes Insulin bei verschiedenen Glucosekonzentrationen auch zu einer Herabsetzung des GSH in isolierten Langerhansschen Inseln von Ratten, wie

Ammon und Mitarbeiter (1980) zeigen konnten.

Ähnlich wie mit Diamid können auch mit tertiärem Butylhydroperoxid der intrazelluläre GSH-Gehalt und der GSH/GSSG-Quotient gesenkt (Ammon et al., 1979 a) sowie die Insulinfreisetzung sowohl nach Glucose und p-Chloromercuribenzoat (Ammon et al., 1977) als auch nach Glucose/Tolbutamid, Glucose/Arginin oder Glucose/Leucin (Niklas, 1978) herabgesetzt werden. Allerdings ist der Wirkungsmechanismus von tertiärem Butylhydroperoxid wesentlich anders, da die Verbindung als Substrat der Glutathionperoxidase in der Zelle auf indirektem Wege eine GSH-Senkung bewirkt.

Die zahlreichen beschriebenen Befunde stützen die Arbeitshypothese, daß die Empfindlichkeit der Beta-Zelle gegenüber der Insulin freisetzenden Wirkung von Stimulatoren wie Glucose, p-Chloromercuribenzoat und Tolbutamid über den Redoxzustand von Zell-Thiolen reguliert wird. Es wäre denkbar, daß Glucose über ihre Metabolisierung im Pentosephosphatshunt und die Redoxsysteme NADPH/NADP und GSH/GSSG den Redoxzustand von Membranthiolen auf die reduzierte Seite verschiebt und dadurch eine wesentliche Voraussetzung für die (ggf. erhöhte) Insulinsekretion schafft.

1.1.2.2 Exogene Thiole und Insulinsekretion

Nachdem die Aufmerksamkeit der Forschung auf die Bedeutung der Zell-Thiole für die Insulinsekretion gelenkt worden war (siehe oben) und mit verschiedenen SH-Reagenzien eine Insulin-Freisetzung erreicht werden konnte (Bloom et al., 1972; Hellman et al., 1973 a/b; Landgraf-Leurs et al., 1978), ergab sich notwendigerweise die Frage, ob dieser Effekt mit exogen zugeführten Thiol-Verbindungen antagonisiert bzw. blockiert werden könnte. Dabei ging man von der Vorstellung aus, daß membranständige Thiolgruppen, die durch

Einwirkung der SH-Reagenzien in oxidierter Form vorliegen, durch die reduktive Kapazität von Thiolen wieder in die SH-Form überführt werden und dadurch die Wirkung der Thiol-Reagenzien aufgehoben wird. Überraschenderweise stellte sich aber heraus, daß exogene Thiole die Insulinsekretion nicht hemmen, sondern unter bestimmten Bedingungen sogar selbst stimulieren. So konnten Hellman und Mitarbeiter (1975) an der Pankreasinsel der Dickmaus zeigen, daß die durch 10 mM Glucose induzierte Freisetzung von Insulin durch 1-Thio-D-Glucose oder reduziertes Glutathion (beides 0,1 mmolar) potenziert wird. Dasselbe ließ sich auch mit dextrangebundenem L-Cystein erreichen. Keines der drei Thiole war allerdings in der Lage, die Insulinsekretion in Abwesenheit von Glucose zu stimulieren (im Gegensatz zu den Thiol-Reagenzien), ein Befund, der später auch mit Dithiothreitol 0,1 mmolar und 1 mmolar am perfundierten Pankreas erhoben wurde (Landgraf-Leurs et al., 1978). Im Gegensatz zu den Untersuchungen von Hellman konnte mit Dithiothreitol aber keine Potenzierung der glucoseinduzierten (20 mM) Freisetzung von Insulin festgestellt werden, sondern eine Hemmung.

Bei den Untersuchungen von Abdel Hamid (1983), ebenfalls am perfundierten Pankreas, ergab sich keine Stimulation der Insulinsekretion bei alleiniger Anwesenheit des entsprechenden Thiols (GSH, L-Cystein), wohl aber bei gleichzeitigem Einsatz von Glucose. Auch an der isolierten Pankreasinsel der Ratte konnte die durch Glycerinaldehyd, Glucose, Tolbutamid oder Leucin induzierte Insulinfreisetzung mit Hilfe von GSH erhöht werden, wobei dieser Effekt jeweils durch Diamid gehemmt wurde. Die durch Glucagon, Isoprenalin oder db-cAMP hervorgerufene Insulinsekretion dagegen läßt sich mit GSH nicht steigern und mit Diamid nicht hemmen (Abdel Hamid, 1983).

Diese Untersuchungsergebnisse deuten darauf hin, daß es offensichtlich thiolabhängige und nicht thiolabhängige

Stimulatoren der Insulinsekretion gibt, wobei es denkbar wäre, daß das thiolabhängige Wirkprinzip nach weiterer Forschung auch einen Weg zu neuen pharmakotherapeutischen Ansätzen öffnet.

1.1.3 Aminosäuren und Insulinsekretion

Wie zahlreiche Autoren bereits gezeigt haben, führen verschiedene Aminosäuren sowohl in vitro als auch in vivo zur Freisetzung von Insulin aus Beta-Inselzellen (Floyd et al., 1966; Sussman et al., 1967; Malaisse und Malaisse-Lagae, 1968; Lambert et al., 1969; Basabe et al., 1971; Fajans et al., 1972). Allerdings besteht noch Unklarheit darüber, wie diese Wirkung der Aminosäuren zustandekommt, zumal auch die Glucoseabhängigkeit des Effektes unterschiedlich ist. Bei Untersuchungen mit Leucin z.B. kamen die verschiedenen Autoren zu sehr unterschiedlichen Ergebnissen: Fajans und Mitarbeiter (1967 & 1972) erzielten bei gesunden Probanden nach Vorbehandlung mit Chlorpropamid und mit leucinreichen Mahlzeiten eine starke Insulinsekretion. Malaisse und Malaisse-Lagae (1968) fanden am Ratten-Pankreasgewebe eine Leucin-bedingte Verstärkung der Insulin-Freisetzung sowohl ohne als auch mit Glucose, ähnlich wie Basabe und Mitarbeiter (1971) am perfundierten Pankreas und Lutz (1981) an der isolierten Insel. Milner (1969) postuliert eine Wirkung am Kaninchen-Pankreas in Abwesenheit von Glucose. Lambert und Mitarbeiter (1969) erreichten eine gesteigerte Insulinsekretion am fötalen Rattenpankreas-Präparat bei Anwesenheit von Coffein. An der isolierten Insel konnten Hoppe (1978) und Schäfer und Schatz (1981) mit Leucin die Freisetzung von Insulin vor allem bei geringen Glucose-Konzentrationen steigern. Außerdem wurde festgestellt, daß die Leucin-induzierte Insulinsekretion beim Kaninchen durch Mannoheptulose und 2-Desoxy-D-Glucose gehemmt werden kann (Lucke et al., 1972) und L-Leucin wie D-Leucin vermutlich über dasselbe System in die

Beta-Zelle transportiert werden (Hellman et al., 1972).
Bei dem Einfluß von Leucin auf den NADPH/NADP-Quotienten ist das Bild ebenfalls uneinheitlich. Während der Quotient durch Leucin allein nicht verändert wird (Malaisse et al., 1980), kann der NADPH-Gehalt (und damit der Quotient) durch Leucin + Glucose signifikant erhöht werden (Ammon et al., 1979 b). Demgegenüber zeigt sich in beiden Fällen (Leucin, Leucin + Glucose) eine Zunahme des NADH. Da das NADPH überwiegend aus dem Pentosephosphatshunt kommt, müßte nach diesen Befunden Leucin allein entweder für eine Produktion von NADPH über den Pentosephosphatshunt ein verstärktes Glucose-Angebot benötigen oder das NADPH auf anderen Wegen (z.B. über NADH und Transhydrogenasen) erhöhen. Dazu würden auch die Berichte von Panten und Mitarbeitern (1972 & 1974) passen, die bei der mit Leucin erzielten Freisetzung von Insulin einen Anstieg der reduzierten Pyridinnukleotide fanden, aber aufgrund der Analysenmethode nicht zwischen NADPH und NADH unterscheiden konnten. Für eine Beteiligung von NADPH an der durch Leucin induzierten Insulinsekretion spricht in jedem Fall die Tatsache, daß Methylenblau den durch Glucose + Leucin erhöhten NADPH/NADP-Quotienten senkt und die gesteigerte Insulinsekretion hemmt (Ammon et al., 1979 b), den NADH/NAD-Quotienten aber nicht senkt (Hoppe, 1978).
Im Hinblick auf den GSH/GSSG-Quotienten schließlich konnte festgestellt werden, daß Leucin (10 mM) oder Glucose (5,6 mM) allein den GSH- und GSSG-Gehalt Langerhansscher Inseln und damit auch den Quotienten nicht verändern. Glucose (5,6 mM) und Leucin (10 mM) zusammen dagegen bewirken eine Zunahme des GSH und eine Abnahme des GSSG, so daß der GSH/GSSG-Quotient ansteigt (Lutz, 1981).

Wird Arginin zur Stimulation der Insulinfreisetzung eingesetzt, sind die Befunde übersichtlicher. Hier konnten Fajans und Mitarbeiter (1967 & 1972) bei gesunden Probanden auch bei Vorbehandlung mit Diazoxid (das die durch Leucin induzierte Insulinsekretion hemmte) eine Sekretionssteigerung

erreichen. Ebenfalls eine Sekretionssteigerung ergab sich bei den Versuchen von Malaisse und Malaisse-Lagae (1968) mit Arginin 10 mM und Glucose 1 mg/ml am Ratten-Pankreasgewebe. Für Milner (1969) ist Arginin in vivo und in vitro die stärkste Insulinsekretions-stimulierende Aminosäure, und Lambert und Mitarbeiter (1969) konnten wie bei Leucin + Coffein auch mit Arginin + Coffein eine erhöhte Freisetzung von Insulin aus fötalem Pankreasgewebe der Ratte erzielen. Bei ihren Untersuchungen mit Arginin und Arginin + Glucose am perfundierten Pankreas stellten Basabe und Mitarbeiter (1971) eine Steigerung der Insulinsekretion nach Arginin und einen additiven Stimulationseffekt bei Arginin + Glucose fest. Allerdings war die Stimulation bei Arginin allein dosisabhängig, und höhere Konzentrationen (25 mg%) Diazoxid hemmten den Effekt der Kombination. Über ähnliche Ergebnisse (ebenfalls am perfundierten Pankreas) berichten auch Levin und Mitarbeiter (1972), wenngleich sie zusätzlich auf mögliche negative Interaktionen von Glucose und Arginin bei der Insulinfreisetzung -vor allem bei höheren Glucosekonzentrationen- hinweisen. Einige Nachteile des Arginin gegenüber Leucin sehen außerdem Schäfer und Schatz (1981), die nach Kultivierung und Inkubation von isolierten Langerhansschen Inseln der Ratte mit Arginin und Glucose eine gegenüber Leucin und Glucose verringerte Sekretion von Insulin beschrieben. Nach Hoppe (1978) führt Arginin nicht bei substimulatorischen, wohl aber bei stimulatorischen Glucose-Konzentrationen zu einer Steigerung der Insulinsekretion aus Inseln. Darin zeigt sich einer der Unterschiede zu Leucin. Einen weiteren Unterschied ermittelten Lucke und Mitarbeiter (1972), die die Leucin-induzierte Insulinfreisetzung mit 2-Desoxy-D-Glucose hemmen konnten, die Arginin-induzierte dagegen nicht. Vergleichbares gilt auch für die Effekte von Arginin auf den NADPH/NADP-Quotienten der Langerhansschen Inseln, der trotz Anwesenheit von stimulatorischen Mengen Glucose nicht signifikant erhöht wird. Der NADH-Gehalt und der NAD-Gehalt der Inseln werden unter diesen Bedingungen

überhaupt nicht beeinflußt (Hoppe, 1978). Diese Befunde zeigen Übereinstimmung mit denen von Panten und Christians (1973), die bei ihren globalen Messungen der reduzierten Pyridinnukleotide keine Fluoreszenzänderung durch Arginin sahen. Eine Parallele zwischen Arginin und Leucin ergibt sich daraus, daß bei beiden die in Kombination mit Glucose induzierte Insulinsekretion durch Methylenblau reduziert werden kann (Hoppe, 1978). Somit bestehen auch zum Mechanismus der Arginin-induzierten Insulinsekretion noch zahlreiche Fragen, wenngleich eine Beteiligung des Arginin-Metabolismus daran bisher ausgeschlossen wird (Hellman et al., 1971).

Neben den Untersuchungen mit Leucin und Arginin sind auch noch Versuche mit weiteren Aminosäuren durchgeführt worden, die allerdings keine wesentlichen neuen Erkenntnisse erbrachten. Dazu zählen die Studien mit Valin (Fajans et al., 1967), Glycin (Malaisse und Malaisse-Lagae, 1968), Histidin (Lambert et al., 1969), Tryptophan (Malaisse und Malaisse-Lagae, 1968), Threonin (Lambert et al., 1969) sowie Lysin und Phenylalanin (Malaisse und Malaisse-Lagae, 1968; Lambert et al., 1969). Über die insulinotrope Wirkung von Cystein, das aus N-Acetyl-L-Cystein durch Deacetylierung entsteht und im Zusammenhang mit der vorliegenden Arbeit von besonderem Interesse ist, sind noch keine entsprechenden Arbeiten veröffentlicht worden. Es konnte aber bereits gezeigt werden, daß Cystein die isolierten Langerhansschen Inseln des Schwertfischs vollständig vor Alloxan-Schäden schützen kann (Watkins et al., 1971), die Bindung von Acrylonitril an mikrosomales Protein der Rattenleber verhindert (Peter und Bolt, 1981), bei isolierten Leberzellen der Ratte zu einem Anstieg des intrazellulären reduzierten Glutathion (GSH) führt (Beatty und Reed, 1981) und diesen Zellen auch Schutz vor toxischem Brombenzol geben kann (Thor et al., 1979). Auch zu den Auswirkungen auf die löslichen Plasma-Thiole nach oraler Gabe bei Ratten wurden einzelne Erkenntnisse gewonnen (Sheffner et al., 1966).

1.1.4 N - Acetyl - L - Cystein

Die Substanz N-Acetyl-L-Cystein (= α-Acetylamino-ß-mercaptopropionsäure) ist vor allem durch die pharmakotherapeutische Verwendung als Mukolytikum bei entsprechenden Erkrankungen des Respirationstraktes bekannt geworden. Die verschiedenen Aspekte dieser Verbindung, die z.B. durch ihre SH-Gruppe Reduktionsäquivalente (u.a. für Disulfidbrücken) bereitstellen kann und nach Deacetylierung eine physiologische Aminosäure (L-Cystein) liefert, haben aber die pharmakologische Forschung veranlaßt, nach weiteren Qualitäten bzw. Verwendungsmöglichkeiten von N-Acetyl-L-Cystein zu suchen, wobei die Ansätze teilweise recht vielversprechend sind.

Betrachtet man die Pharmakokinetik von N-Acetyl-L-Cystein, so ist zunächst die Resorption von Interesse. Nach Untersuchungen von Sheffner (1965) und Sheffner und Mitarbeitern (1966) wird die Substanz bei oraler Gabe sowohl bei der Ratte als auch beim Menschen gut resorbiert, dagegen ist die Resorption nach topischer Applikation nur minimal (Bartek et al., 1972). Die Gewebeverteilung nach oraler Gabe, die mit radioaktiv markiertem (^{35}S) N-Acetyl-L-Cystein geprüft wurde, ergibt bei der Ratte nach 2 Stunden die höchsten Spiegel in Niere und Leber, gefolgt von den Nebennieren, der Lunge, der Milz und dem Blut. Die geringste Anreicherung fand sich im Muskel und im Gehirn. Nach 24 Stunden hatte die Radioaktivität in der Niere um 70%, in der Leber um 74% und im Blut um 56% abgenommen, außerdem wurden in diesem Zeitraum 56% der Gesamtradioaktivität im Urin ausgeschieden (Sheffner et al., 1966). Mit Hilfe der Autoradiographie der markierten Substanz konnte außerdem Fawell (1976) nachweisen, daß sich N-Acetyl-L-Cystein nach intravenöser Gabe bei Ratten besonders stark im Respirationstrakt und in Organen mit hoher Protein-Syntheserate, darunter auch im Pankreas, anreichert. Dies deutet darauf hin, daß die Verbindung

relativ schnell in neu synthetisiertes Protein eingebaut wird bzw. mittels labiler Disulfidbrücken an Organproteine gebunden wird (Sheffner, 1965). Die Verteilungs-Untersuchungen mit der markierten Substanz konnten allerdings naturgemäß keine Aussage darüber machen, ob es sich bei der festgestellten Radioaktivität um N-Acetyl-L-Cystein oder um Metaboliten der Substanz handelte. Um mögliche Metaboliten der Verbindung zu identifizieren, führten Sheffner und Mitarbeiter (1966) deshalb zusätzliche chromatographische Untersuchungen mit Extrakten aus Acetylcystein-vorbehandeltem Lebergewebe der Ratte durch und konnten zeigen, daß N-Acetyl-L-Cystein in vivo und in vitro vor allem zu Cystein und Cystin metabolisiert wird. Eine geeignete Auftrennung der Metaboliten im Urin gelang ihnen zwar nicht, doch wurde anorganisches Sulfat als Hauptbestandteil ermittelt.
Diese Forschungsergebnisse wurden durch die Befunde von Lorber und Mitarbeitern (1970) bestätigt und durch die Arbeiten von Bonamomi und Gazzaniga (1980) ergänzt. Sie stellten fest, daß bei der Ratte nach intravenöser Gabe von 50 mg radioaktiv markierter Substanz pro kg Körpergewicht die Radioaktivität im Plasma bis zur 40. Minute abnimmt, sich dann aber kaum noch ändert (Meßzeitraum: 120 Minuten). Ebenfalls mit markierter Substanz konnten sie nachweisen, daß bei Ratten die orale Gabe der intramuskulären Verabreichung praktisch gleichwertig ist, und daß die Ausscheidung von N-Acetyl-L-Cystein bzw. seiner Metaboliten relativ langsam verläuft. Der letztgenannte Befund konnte auch bei Hunden bestätigt werden. Im Gegensatz zu den Untersuchungen von Sheffner und Mitarbeitern (1966) finden Bonamomi und Gazzaniga aber eine noch weit geringere Radioaktivitäts-Ausscheidung, und zwar je nach Verabreichungsweg lediglich 20 bis 42 Dosis% in 96 Stunden. Außerdem ergab sich, daß 1 Stunde nach Verabreichung der markierten Substanz (100 mg/kg oral, Ratte) die Plasma-Radioaktivität überwiegend aus Acetylcystein und Cystein bestand, die über Dithiothreitol-spaltbare Disulfidbrücken an Proteine gekoppelt sind.

Bei den humanpharmakologischen Untersuchungen mit der markierten Verbindung (100 mg einmalig per os) trat die maximale Radioaktivität im Plasma ebenfalls nach 2 bis 3 Stunden auf. Durch die geringe Radioaktivitätsausscheidung in den ersten 24 Stunden (nur 22%) wurde aber deutlich, daß orales N-Acetylcystein beim Menschen noch langsamer als beim Tier (Ratte, Hund) ausgeschieden wird. So konnte auch nach 5 Stunden im Patientenplasma noch eine hohe Aktivität gemessen werden, die aus freier, unveränderter Substanz und Metaboliten (22%), aus unveränderter Substanz -mittels labiler Disulfidbrücken an Proteine gebunden- (14%) und aus fest proteingebundener Substanz (64%) bestand (Rodenstein et al., 1978).

Ein weiterer Ansatzpunkt für die Beurteilung der Verstoffwechselung von N-Acetyl-L-Cystein ist dessen Wirkung auf die Spiegel löslicher Thiole in Plasma und Geweben. Nach oraler Verabreichung von ca. 2 mmol/kg Körpergewicht der Substanz an Ratten beobachteten Sheffner und Mitarbeiter (1966) eine leichte Erhöhung der löslichen Thiole im Plasma, ebenso wie in der Lunge, im Muskel und in der Leber. Die Zunahme war aber in keinem Fall signifikant, die Angaben zu weiteren Organen (Niere, Milz und Nebennieren) nicht verwertbar. Erfolgreicher waren dieselben Untersucher beim Hund, wo sie bei oraler wie bei intravenöser Gabe (jeweils 1,65 mmol/kg) eine signifikante Steigerung der löslichen Thiole im Blut erzielten. Die Ausscheidung von SH-Verbindungen im Urin wurde bei diesen Versuchen bei den beiden Spezies unterschiedlich beeinflußt, betraf aber jeweils nur einen minimalen Teil der verabreichten Dosis. Lorber und Mitarbeiter (1970) verabreichten N-Acetylcystein intravenös an Mäuse und stellten in verschiedenen Geweben einen signifikanten Anstieg der löslichen und proteingebundenen Thiole fest. Diese Thiol-Gruppen waren auch im Plasma von Ratten signifikant erhöht, denen 100 mg/kg der Substanz oral verabreicht worden waren (Bonamomi und Gazzaniga, 1980).

Die entsprechenden Untersuchungen am Menschen (gesunde Probanden, Dopppelblindstudie, kontrolliert) wurden von Maddock (1980) durchgeführt. Er fand, daß die einmalige orale Gabe (400 mg) von N-Acetyl-L-Cystein gut meßbare Plasmaspiegel (HPLC) der freien Substanz ergibt und zu einer signifikanten Erhöhung der Gesamt-Thiole, der löslichen, proteingebundenen und disulfidgebundenen niedermolekularen Thiole sowie des Plasma-Cystins führt. Bei den L-Cystein-Plasmaspiegeln gab es keine signifikante Änderung. Wurden Mehrfachdosen (3 x 200 mg/Tag über 10 Tage) gegeben, ergaben sich ebenfalls meßbare Spiegel der Substanz im Plasma und eine signifikante Zunahme der Gesamt-Thiole und der proteingebundenen Thiole. Auch das L-Cystein und die disulfidgebundenen Thiolgruppen im Serum waren erhöht. Bei den Veränderungen der löslichen Thiole ließ sich kein signifikanter Unterschied zur Placebo-Gruppe nachweisen, Cystin wurde nicht gemessen. Die Ausscheidung des in Form der Substanz verabreichten Schwefels über den Urin erfolgt nach den Ergebnissen von Maddock (1980) offensichtlich überwiegend als anorganisches Sulfat, ein Befund, der auch in den vorausgegangenen Tierversuchen erhoben worden war.

Von Bonamomi und Gazzaniga (1980) wurden die Löslichkeit, die Stabilität in künstlichem Magensaft (USP XIX) und künstlicher intestinaler Flüssigkeit (USP XIX) sowie die gastrointestinale Verträglichkeit (Tierversuch) von N-Acetyl-L-Cystein geprüft. Außerdem untersuchten sie die Wirkungen der Substanz auf Antikörpersynthese (Mäuse, in vivo) und menschliche Serumimmunglobuline (in vitro) sowie deren akute, subakute und chronische Toxizität. Schließlich führten sie bei Ratten und Kaninchen Fertilitätsstudien, Teratogenesestudien und Untersuchungen über den Einfluß der Verbindung auf die peri- und postnatale Periode durch, ergänzt durch Mutagenitätstests in vitro. In keiner dieser Untersuchungen stellten sich nachteilige Eigenschaften des N-Acetyl-L-Cystein heraus, mit Ausnahme gastrointestinaler Irritationen

(Mucosa-Erosionen) nach sehr hohen Dosen in Suspensions- oder Tablettenform.

Der Einsatz von N-Acetyl-L-Cystein in der Pharmakotherapie, der mit der Verwendung als Mukolytikum seinen Anfang nahm, ist in der jüngeren Vergangenheit auch auf zahlreiche andere Indikationen ausgedehnt worden. Dadurch haben die therapeutischen Aspekte (Dosierung, Anwendungsgebiete, Interaktionen usw.) dieser Substanz einen Umfang angenommen, der an dieser Stelle nicht vollständig abgehandelt werden kann. Die Darstellung der Therapie mit N-Acetyl-L-Cystein wird daher im Folgenden auf einen Überblick über die bisher bekannten Indikationen und die evtl. Nebenwirkungen der Substanz beschränkt.
Die Wirkungsweise der Verbindung bei einigen der Indikationen ist noch unbekannt. Bekannt ist, daß N-Acetyl-L-Cystein in der Lage ist, durch eine Austauschreaktion die Disulfidbrücken von Mukoproteinen zu spalten unter Bildung eines gemischten Disulfids und einer freien SH-Gruppe. Dies ist von entscheidender Bedeutung für die Konsistenzabnahme des Sputums bei der akuten und chronischen Bronchitis, der bekanntesten Indikation für diese Substanz (Hirsch et al., 1965; Paez et al., 1966; Ramirez, 1966; Hirsch und Kory, 1967; Hurst et al., 1967; Kory et al., 1968; Chodosh, 1971; Chodosh et al., 1975; Grassi und Morandini, 1976; Brocard et al., 1980; Grassi, 1980; Boman et al., 1983). Ein weiteres Einsatzgebiet ist die zystische Fibrose (Reas, 1963 & 1964; Stamm und Docter, 1965; Denton et al., 1967; Gracey et al., 1969), wo der Einsatz von N-Acetylcystein inzwischen aber in Frage gestellt wird (Mitchell und Elliott, 1981 & 1982). Unbestritten ist inzwischen der Wert der Substanz bei der Paracetamol-Vergiftung, wo N-Acetylcystein als Glutathion-Ersatz direkt den toxischen Metaboliten des Paracetamol binden soll (Peterson und Rumack, 1977 & 1978; Shenfield und Oh, 1980; Prescott, 1981). Zweifelhaft ist der Einsatz bei chronisch-obstruktiven Lungenerkrankungen (Hirsch und Kory,

1967; Hirsch et al., 1970; Rao et al., 1970) und zur Prophylaxe postoperativer Lungenatelektasen (Thomas et al., 1966 & 1967). Weitere, allerdings noch nicht gesicherte Indikationen sind Hornhautverätzungen am Auge durch Laugen (Slansky et al., 1970; Lemp und Roddy, 1974), Ileus (Derman et al., 1975; Hodson et al., 1976) und die Prophylaxe bzw. Therapie der Doxorubicin-bedingten Kardiomyopathie (Dresdale et al., 1982).
Bei den möglichen Nebenwirkungen von N-Acetyl-L-Cystein steht eindeutig die Bronchokonstriktion im Vordergrund, die mit Hilfe von Lungenfunktionstests nachgewiesen werden kann (Bernstein und Ausdenmoore, 1964; Hurst et al., 1967; Semerdjian et al., 1967; Hirsch und Kory, 1967; Kory et al., 1968; Pulle et al., 1970; Rao et al., 1970; Dano, 1971; Wactemath und Bergman, 1973). Daneben wurden auch anaphylaktische Reaktionen beschrieben (Walton et al., 1979; Vale und Wheeler, 1982) und nach Untersuchungen an isolierten Trachealabschnitten von Frettchen eine ziliostatische Nebenwirkung postuliert (Dreisin und Mostow, 1979).

Verschafft man sich einen Überblick über die Arbeiten verschiedener Forschungsgruppen über N-Acetyl-L-Cystein aus der jüngeren Vergangenheit, so zeigt sich, daß die Bemühungen vor allem darauf gerichtet sind, einen möglichen protektiven Effekt dieser SH-Verbindung nutzbar zu machen. Die Substanz ist beispielsweise in der Lage, isolierte Ratten-Hepatozyten vor den toxischen Wirkungen von Brombenzol zu schützen (Thor et al., 1979) und den hepatotoxischen Wirkungen von Halothan bei der Ratte vorzubeugen (Keaney und Cocking, 1981). Bei dieser Tierspezies kann N-Acetylcystein außerdem die Aktivitätsminderung der mischfunktionellen Oxidasen der Leber in vivo und die Denaturierung von Cytochrom P-450 in vitro durch Cyclophosphamid (Berrigan et al., 1980) sowie die durch dieselbe Verbindung induzierte Cystitis (Botta et al., 1973) verhindern. Freeman und Mitarbeiter (1980) zeigten an Mäusen, daß die Substanz einen Schutzeffekt gegen die

Kardiotoxizität von Adriamycin bietet, ohne dessen Antitumor-Aktivität zu beeinträchtigen. Durch diese Befunde ermutigt wurden auch Prüfungen am Menschen durchgeführt, bei denen die durch Ifosfamid-Therapie induzierte Hämaturie (hämorrhagische Cystitis) durch N-Acetylcystein verhindert werden konnte, ohne daß eine Einschränkung der zytostatischen Wirksamkeit von Ifosfamid beobachtet worden wäre (Morgan et al., 1981; Slavik und Saiers, 1982). Sollten sich die Ergebnisse dieser humanpharmakologischen Studien bestätigen, wäre dies ein zukunftsweisender Therapiefortschritt.

1.2 Fragestellung

1.) In der vorliegenden Arbeit sollte zunächst geprüft werden, ob und wie sich die Plasmaspiegel der löslichen, proteingebundenen und Gesamt-Thiole nach intravenöser Gabe verschiedener Dosen von N-Acetyl-L-Cystein bei Ratten verändern und ob die diesbezüglichen Ergebnisse früherer Untersuchungen und Autoren unter eigenen Bedingungen bestätigt werden können.

2.) Nach dem bisherigen Kenntnisstand konnte man annehmen, daß ein Zusammenhang zwischen dem intrazellulären Redoxsystem von Thiolgruppen Langerhansscher Inseln und der durch Glucose induzierten Insulinsekretion besteht. Deshalb sollte in dieser Arbeit untersucht werden, ob sich die glucoseinduzierte Insulin-Freisetzung durch die intravenöse Zufuhr des Thiols N-Acetyl-L-Cystein steigern läßt und ob auch die Gabe von N-Acetyl-L-Cystein allein zu einer verstärkten Sekretion von Insulin führt. Außerdem sollte der Frage nachgegangen werden, ob mit einer Vorabinjektion von N-Acetyl-L-Cystein die Elimination der Glucose aus dem Plasma nach Gabe eines Glucose-Bolus beschleunigt werden kann.

3.) Abschließend sollte untersucht werden, ob die i.v.-Injektion von Glucose den Kurvenverlauf der Thiol-Plasmaspiegel nach der intravenösen Gabe von N-Acetyl-L-Cystein in irgendeiner Form verändert.

2. M A T E R I A L

2.1 Versuchstiere

Verwendet wurden Wistar-Ratten weiblichen Geschlechts im Alter von 3 bis 5 Monaten. Die Haltung erfolgte in einem temperaturkontrollierten Raum (24° C) unter Einhaltung eines 12 Stunden Tag/Nacht-Rhythmus. Die Tiere erhielten Standard-Trockenfutter der Firma Altromin, Lage/Lippe und Trinkwasser ad libitum.

2.2 Geräte

Gamma-Counter System Gamma 310 Glucose Analyzer 2 Digital-pH-Meter Mod. 3560	Beckman Instruments GmbH, München
Spektralphotometer PM 6 mit Drucker XP 2	Carl Zeiss, Oberkochen
Kühlzentrifuge Cryofuge 20-3	Christ GmbH, Osterode
Thermostat 3520	Eppendorf Gerätebau, Hamburg
Operationstisch für Ratten, beheizbar	
Beatmungspumpe	Braun, Melsungen
Tischcomputer P 602	Olivetti AG

2.3 Chemikalien und Enzyme

Aktivkohle Norit A	Serva, Heidelberg
alpha-D-Glucose	
DTNB (Ellman's Reagenz)	Boehringer, Mannheim
Glucose Reagent Kit	Beckman, München
N-Acetyl-L-Cystein	Sigma Chemical Company, St. Louis
Heparin-Natrium	medac, Hamburg
Insulin Radioimmunoassay Kit (INSIK)	Isotopen-Diagnostik CIS GmbH, Dreieich
Pentobarbital (Nembutal)	Serva, Heidelberg
Ratteninsulin	Novo Laboratorien, Kopenhagen

Alle anderen, hier nicht aufgeführten Chemikalien wurden von der Firma Merck, Darmstadt, in der jeweils reinsten Form (p.a.) bezogen.

2.4 Pufferlösungen

Puffer für die Insulinbestimmung (pH 7,4)

$Na_2HPO_4 \times 2\ H_2O$	10,6 g
Titriplex 3	3,72 g
BSA	1,0 g
Aqua bidest. ad	1000 ml

Kaliumphosphat-Puffer (pH 7,5)

KH_2PO_4	3,32 g
$K_2HPO_4 \times 3\ H_2O$	28,67 g
Aqua bidest. ad	1000 ml

EDTA-Kaliumphosphat-Puffer

KH_2PO_4	3,32 g
$K_2HPO_4 \times 3\ H_2O$	28,67 g
$C_{10}H_{14}K_2N_2O_8 \times 2\ H_2O$ (EDTA)	2,22 g
Aqua bidest. ad	1000 ml

3. METHODEN

3.1 Durchführung der Tierversuche

Um die Plasma-Konzentrationen exogen zugeführter (N-Acetyl-L-Cystein, Glucose, Insulin) und endogen freigesetzter (Insulin) Substanzen verfolgen zu können, muß die Möglichkeit geschaffen werden, dem Versuchstier innerhalb kurzer Zeitabstände Blutproben zu entnehmen, deren Volumina für die jeweiligen Bestimmungen ausreichen. Ferner muß gewährleistet sein, daß die Applikation tatsächlich intravasal, d.h. ohne resorptionsbedingte Verzögerungen erfolgt.
Aus den genannten Gründen ergibt sich die Notwendigkeit, am Versuchstier geeignete Blutgefäße zur intravenösen Injektion und zur Blutprobenentnahme zu präparieren. Zur Durchführung der pharmakokinetischen Messungen und der intravenösen Glucose - Belastungstests wurde die rechte Vena jugularis für die Applikation und die linke Arteria carotis zur Blutentnahme unter Anwendung der nachfolgend beschriebenen Präparationstechnik dargestellt.

3.1.1 Präparation der Versuchstiere

Vor dem operativen Eingriff werden die Tiere gewogen, durch intraperitoneale Injektion von 50 mg Pentobarbital pro kg Körpergewicht narkotisiert und auf einem beheizten (34°C) Operationstisch auf dem Rücken liegend fixiert.
In der Halsregion wird die Haut drei Zentimeter in Längsrichtung eingeschnitten. Das oberhalb der Clavicula gelegene Bindegewebe wird kopfwärts gezogen, so daß die darunterliegenden Muskelschichten freigelegt werden.
Der Musculus sternohyoideus wird entlang seiner Verlaufsrichtung mit einer Pinzette aufgespalten. Durch den entstandenen, ein Zentimeter langen Spalt sind die Trachea und die

Arteria carotis zugänglich.
Zunächst wird die Trachealkanüle gelegt, wodurch ein mögliches Ersticken des narkotisierten Tieres verhindert wird. Dazu wird die Trachea mit einem Faden angeschlungen, zwischen zwei Knorpelringen eingeschnitten und ein drei Zentimeter langer PVC-Schlauch (Durchmesser außen 1.9 mm, innen 1.3 mm) eingebunden.
Weiter wird die rechte Vena jugularis externa vom Bindegewebe freipräpariert und zweifach angeschlungen. Dann wird das Gefäß mit einem Faden distal unterbunden und in proximaler Richtung angeschnitten. Als Venenkatheter wird ein zehn Zentimeter langer PVC-Schlauch (Durchmesser innen 0,4 mm, außen 0,8 mm) eingeführt und mit dem zweiten Faden fixiert. Der Schlauch ist mit einer 1 ml - Spritze verbunden, welche das berechnete Volumen einer Heparin-Natrium-Lösung (5.000 E/ml) enthält. Die Dosis beträgt 750 E pro 100 g Körpergewicht (siehe 3.2.4.1). 50% der Heparin-Lösung werden sofort langsam injiziert.
Schließlich wird auf der linken Seite die Arteria carotis aus dem umgebenden Bindegewebe gelöst, von den begleitenden Strängen des Nervus vagus unter größtmöglicher Vorsicht abgetrennt und ebenfalls mit zwei Fäden angeschlungen. Zur Katheterisierung der Arteria carotis wird ein PVC-Schlauch gleicher Stärke wie bei der Vena jugularis verwendet. Das Gefäß wird distal durch einen Faden und proximal mit einer Gefäßklemme unterbunden. Der abgeklemmte Abschnitt wird angeschnitten, der Katheter eingeschoben und fixiert. Nachdem der Schlauch am anderen Ende mit einer Klemme verschlossen worden ist, wird die Gefäßklemme entfernt. Durch Öffnen der Schlauchklemme kann tropfenweise arterielles Blut entnommen werden.
Zum Schutz vor Austrocknung wird das Präparat mit einem mit physiologioscher Kochsalzlösung getränkten Mulltupfer abgedeckt.
Nach einer Äquilibrationszeit von fünf Minuten wird die restliche Heparin-Lösung injiziert.

3.1.2 Versuche zur Pharmakokinetik des N-Acetyl-L-Cystein

3.1.2.1 Applikation

Für die intravenöse Verabreichung von N-Acetyl-L-Cystein wurde die Substanz in 0,9%iger Natriumchlorid-Lösung gelöst. Bei den Versuchen mit 0,1 mmol/kg Körpergewicht wurde eine Lösung von 100 µmol/ml (G/V), bei den Versuchen mit 0,25 mmol/kg Körpergewicht eine Lösung von 60 µmol/ml (G/V) und bei den Versuchen mit 0,3 mmol/kg Körpergewicht eine Lösung von 100 µmol/ml (G/V) N-Acetyl-L-Cystein verwendet. Die Lösungen wurden jeweils vor einer Versuchsreihe frisch zubereitet, da die Substanz in Lösung nicht über längere Zeit haltbar ist.
Zur Verabreichung wurde ein dem Körpergewicht des Versuchstieres entsprechendes Volumen in einer 1 ml - Spritze aufgezogen und die Lösung rasch injiziert. Der Venenkatheter wurde anschließend mit 0,2 ml physiologischer Natriumchlorid-Lösung nachgespült.
Bei der Gabe der beiden höheren Dosierungen wurden die Konzentrationen der Lösungen niedriger gewählt, um gleichzeitig mit der Verabreichung des N-Acetyl-L-Cystein einen Volumenausgleich für die Blutverluste der Versuchstiere während der Präparation und der späteren Blutprobenentnahme zu schaffen. Bei den Versuchen, die ausschließlich der Untersuchung der Pharmakokinetik von N-Acetyl-L-Cystein dienten, war daher im weiteren kein Volumenausgleich durch physiologische Natriumchlorid-Lösung erforderlich wie bei den Versuchen mit 0,1 mmol N-Acetyl-L-Cystein/kg Körpergewicht und zusätzlichen Glucose- und Insulinbestimmungen (siehe 3.1.3.4).

3.1.2.2 Abnahme der Blutproben

Bei den Versuchen, die ausschließlich der Untersuchung der Pharmakokinetik von N-Acetyl-L-Cystein dienten, wurde

unmittelbar vor sowie 2, 5, 10, 15, 20, 25 und 30 Minuten nach Injektion der N-Acetyl-L-Cystein-Lösung jeweils eine Blutprobe mit einem Volumen von ca. 200 µl abgenommen. Das Blut wurde in 1,5 ml Eppendorf-Reaktionsgefäßen aufgefangen und im weiteren wie unter Punkt 3.2.4 beschrieben aufgearbeitet.
Die Probennahme bei den übrigen Versuchen ist in Abschnitt 3.1.3.4 beschrieben.

3.1.3 Intravenöser Glucose - Belastungstest

3.1.3.1 Applikation

Alpha-D-Glucose wurde bei einer Dosierung von 250 mg/kg Körpergewicht als 10%ige (G/V) Lösung und bei einer Dosierung von 500 mg/kg Körpergewicht als 20%ige (G/V) Lösung über einen Zeitraum von 30 Sekunden injiziert. Danach wurde der Venenkatheter mit 0,2 ml physiologischer Natriumchlorid-Lösung nachgespült.
Folgende nach 3.1.2.1 hergestellte Lösungen von N-Acetyl-L-Cystein wurden je nach Versuchsanordnung 30, 10 bzw. 0,5 Minuten vor der Glucose-Injektion über 20 bis 30 Sekunden verabreicht:

	NAC - Dosierung (mmol/kg KG)	Konz. d. Lösung (mmol/ml)
in Kombination mit		
A) 250 mg Glucose/kg KG	0,3	0,1
	1,0	0,5
B) 500 mg Glucose/kg KG	0,025	0,025
	0,05	0,05
	0,1	0,1

Auch hier wurde anschließend der Venenkatheter mit 0,2 ml

physiologischer Natriumchlorid-Lösung nachgespült.
Die Lösungen unter B) wurden im Verhältnis zu denen unter A) konzentrierter gewählt, da bei den entsprechenden intravenösen Glucose-Belastungstests der Gruppe B) parallele Insulin-Bestimmungen durchgeführt wurden, die zusätzlich eine entsprechende Volumensubstitution während des Versuches erforderlich machten (siehe 3.1.3.4).
Die Kontrolltiere erhielten 10 Minuten vor der Glucose-Gabe das gleiche Volumen einer 0,9%igen Natriumchlorid-Lösung. Für die Versuchsreihe mit 0,1 mmol N-Acetyl-L-Cystein/kg 30 Minuten vor Glucose 0,5 g/kg wurde keine zusätzliche Kontrollgruppe eingerichtet, weil in diesem Fall die Plasma-Glucose-Spiegel vor der Glucose-Gabe gleichbleiben (siehe Abschnitt 4.2.3).

3.1.3.2 Abnahme der Blutproben bei alleiniger Bestimmung der Blutglucose

15, 10, 5 und 0,5 Minuten vor sowie 2, 5, 10, 15, 20, 25, 30, 40, 50 und 60 Minuten nach der Glucose-Injektion wurden jeweils ca. 100 µl Blut in einem Eppendorf-Reaktionsgefäß aufgefangen und anschließend entsprechend Abschnitt 3.3 aufgearbeitet.

3.1.3.3 Abnahme der Blutproben zur Bestimmung der Blutglucose und des Plasma - Insulin - Gehalts

Aufgrund des großen Plasmabedarfs für die Insulinbestimmung wurde die Durchführung des intravenösen Glucose-Belastungstests gegenüber 3.1.3.2 folgendermaßen geändert: Blutproben mit einem Volumen von ca 300 µl werden 35*, 25*, 15*, 10, 5 und 0,5* Minuten vor sowie 2*, 5, 10, 15, 20*, 25, 30*, 35*, 40*, 50* und 60* Minuten nach der Glucose-Gabe abgenommen. Die mit einem Stern (*) gekennzeichneten Zeiten wurden

aufgrund der jeweiligen Versuchsanordnung nicht bei jeder Untersuchung berücksichtigt. Zur Vermeidung von Kreislaufstörungen wurden außerdem nach jeder Probenabnahme 0,3 ml physiologische Natriumchlorid-Lösung injiziert.
Die weitere Aufarbeitung erfolgte entsprechend den Abschnitten 3.3 und 3.4 .

3.1.3.4 Abnahme der Blutproben zur Bestimmung der Blutglucose, des Plasma - Insulin - Gehalts sowie der Konzentration löslicher Thiole, proteingebundener Thiole und des Gesamt - Thiolgehaltes im Plasma

Um zusätzlich zur Bestimmung der Blutglucose und des Plasma-Insulin-Gehalts auch die Konzentration löslicher Thiole, proteingebundener Thiole und den Gesamt-Thiolgehalt im Plasma ermitteln zu können, wurde bei den entsprechenden Versuchen das Volumen der entnommenen Blutproben auf ca. 400-450 µl erhöht und 0,5 Minuten vor der Glucosegabe (0,5 g/kg KG) eine zusätzliche Blutprobe abgenommen, um die Thiol-Plasmaspiegel kontinuierlich verfolgen zu können. Dies war bei den übrigen Versuchen mit 0,5 g Glucose/kg Körpergewicht nicht erforderlich. Ansonsten wurden die Versuche wie unter 3.1.3.1 beschrieben durchgeführt und anschließend die Proben zur Bestimmung der Thiole (3.2), der Glucose (3.3) und des Insulins (3.4) verwendet.

3.2 Bestimmung der Konzentration löslicher Thiole und des Gesamt - Thiolgehaltes im Plasma

3.2.1 Auswahl der Methode

Für die Bestimmung von Thiolgruppen in biologischem Material wurden in den vergangenen Jahrzehnten die verschiedensten Methoden entwickelt bzw. weiterentwickelt. 1955 gelang es E. Benesch und Mitarbeitern, eine bereits früher bekannte polarographische Bestimmungsmethode für Thiolgruppen weiter zu verfeinern und eine äußerst exakte Bestimmung der -SH-Gruppen von kristallinen Proteinen durchzuführen. Diese Methode wurde in späteren Jahren dann noch weiter vervollkomnet (Lorber et al., 1964 et 1970). In der Folgezeit gewannen vor allem spektralphotometrische Meßverfahren an Bedeutung, darunter die -SH-Bestimmung mit p-Chloromercuribenzoat (Boyer 1954), die ebenfalls weiter entwickelt wurde (Isles und Jocelyn; 1963), und die -SH-Bestimmung mit 5,5'-Dithio-bis(-2-nitrobenzoesäure) (Ellman 1959). Auch die kolorimetrische Thiolbestimmung mit Hilfe von Fe^{3+} und 1,10-Phenanthrolin (Davis et Lindstrom, 1972) ist erwähnenswert, sie eignet sich wegen ihrer einfachen Durchführung vor allem auch zur Bestimmung von verschiedenen Thiolen in pharmazeutischen Zubereitungen (Raggi 1982).

Die Bemühungen der jüngsten Zeit zielten vor allem darauf, Bestimmungsmethoden zu entwickeln, die eine Einzelbestimmung der verschiedenen physiologischen bzw. nichtphysiologischen Thiole ermöglichen. Bei pharmakokinetischen Untersuchungen wurde dies durch eine radioaktive Markierung des Schwefelatoms (^{35}S) möglich, so auch für N-Acetyl-L-Cystein (Sheffner et al., 1966). Die qualitative und quantitative Bestimmung von Einzelthiolen aus biologischem Material

bereitete allerdings bis vor kurzem größte Schwierigkeiten, weil vor allem die niedermolekularen Thiole sehr leicht oxidiert werden und eine hohe Reaktivität besitzen. Es mußte daher ein Verfahren gefunden werden, bei dem ein Schutz der -SH - Gruppen mit einer exakten Auftrennung des Thiolgemisches verbunden werden konnte. Dies gelang 1980 (Fahey et al.). Dieselbe Forschungsgruppe schaffte es dann auch, das neu erarbeitete Verfahren (Derivatisierung und Auftrennung durch Ionenaustauscher-Chromatographie) zu einer quantitativen Bestimmungsmethode auszubauen und den großen Zeitaufwand für die Thioltrennung durch Einsatz der Hochdruckflüssigkeitschromatographie erheblich zu reduzieren (Fahey et al., 1981; Newton et al., 1981).

Für die Zukunft Bedeutung haben dürfte schließlich auch noch die 1982 von Carnevale, Healey und Cole veröffentlichte Methode zur qualitativ/quantitativen Thioltrennung, die nach ähnlichen Grundsätzen arbeitet (Derivatisierung mit aromatischen Thiosulfonaten und quantitative Bestimmung durch Hochdruckflüssigkeitschromatographie).

Für die vorliegende Arbeit wurde aufgrund der technischen Voraussetzungen und der Aufgabenstellung die Bestimmungsmethode nach Ellman (siehe 3.2.2) gewählt, die mit geringerem Zeitaufwand eine spezifische und sehr genaue Bestimmung von -SH-Gruppen ermöglicht. Nicht mit erfaßt werden lediglich die Thiolgruppen von Ergothionein und Thiouracil, da diese nicht mit 5,5'-Dithio-bis(-2-nitrobenzoesäure) reagieren. Für die vorliegende Untersuchung ist das aber ohne Bedeutung.

3.2.2 Beschreibung der Methode

Zur Bestimmung des Gesamt-Thiolgehaltes und der Konzentration löslicher und proteingebundener Thiole wurde das spektralphotometrische Verfahren nach Ellman (1959) angewandt. Bei dieser Methode erfolgt eine reduktive Spaltung der Disulfid-Bindung der 5,5'-Dithiobis(-2-nitrobenzoesäure) (= DTNB, Ellman's Reagenz) durch reduzierte Thiolverbindungen:

DSSD (= DTNB) + 2 RSH = 2 DSH + RSSR

Das durch reduktive Spaltung der Disulfid-Bindung des Ellman's Reagenz entstehende Produkt ist gelb gefärbt, absorbiert Licht der Wellenlänge 412 nm und ermöglicht daher eine indirekte quantitative Bestimmung der Thiole.

3.2.3 Empfindlichkeit der Methode

In einem Vorversuch wurde der Konzentrationsbereich ermittelt, in dem N-Acetyl-L-Cystein mit der spektralphotometrischen Methode nach Ellman bestimmt werden kann. Dazu wurde im Spektralphotometer bei einer Wellenlänge von 412 nm die Extinktionszunhame von Proben mit verschiedenen Konzentrationen von N-Acetyl-L-Cystein gemessen. Dabei zeigte sich, daß die Zunahme der Extinktion im Bereich von 5 bis 30 nmol N-Acetyl-L-Cystein/Ansatz linear war. Der entsprechende Extinktionskoeffizient betrug 13,5 x 10^3.

3.2.4 Aufarbeitung der Blutproben für die Bestimmung der löslichen Thiole und des Gesamt - Thiolgehaltes

3.2.4.1 Fehlerquellen

Zu den möglichen Fehlerquellen, die zu einer Verfälschung der Ergebnisse führen können, gehören vor allem

a) Hämolyse
b) Deacetylierung und Oxidation des N-Acetyl-L-Cystein

zu a): Erythrocyten besitzen einen sehr hohen Gehalt an -SH-Verbindungen (vor allem Glutathion). Durch eine partielle Hämolyse während der Gewinnung und Aufarbeitung der Blutproben würden Thiole freigesetzt und dadurch zu hohe Plasmakonzentrationen gemessen werden. Um die Hämolyse weitgehend zurückzudrängen, wurde die Blutgerinnung durch Heparinisierung des Versuchstieres unterbunden. Dabei entspricht die verwendete Heparin-Dosis von 750 E/100 g Körpergewicht den Angaben von Häberle und Siess (1979), die ähnliche Versuche durchführten.
Außerdem ist zu berücksichtigen, daß auch N-Acetyl-L-Cystein selbst hämolytische Eigenschaften besitzt (Sapp et al., 1975).
Das ungerinnbar gemachte Blut wurde ferner schonend in Plastikgefäßen aufgefangen.

zu b): Die Instabilität der Thiole erfordert Maßnahmen, durch die eine korrekte Bestimmung gewährleistet wird. Zu diesen Maßnahmen gehören vor allem Kühlung sowie schnelles Arbeiten und Enteiweißen der Plasmafraktion zur Bestimmung der löslichen Thiole.

3.2.4.2 Aufarbeitung der Blutproben zur Bestimmung des Gesamt - Thiolgehaltes

Die nach 3.1.2.2 gewonnenen Blutproben mit einem Volumen von

200 µl wurden sofort 10 Minuten bei 10.000 x g und einer Temperatur von 2° C zentrifugiert. Unmittelbar nach Beendigung der Zentrifugation wurden je nach Dosierung des N-Acetyl-L-Cystein 30 bzw. 20 µl Plasma abgetrennt, mit 20 bzw. 30 µl EDTA-Kaliumphosphat-Puffer aufgefüllt und bis zur anschließenden Bestimmung des Gesamt-Thiolgehaltes 15 Minuten kühl stehen gelassen.

3.2.4.3 Aufarbeitung der Blutproben zur Bestimmung der Konzentration löslicher Thiole

Nach Untersuchungen von Grimm (1978) eignet sich Metaphosphorsäure zur Ausfällung der Plasmaproteine, da sie die nachfolgende -SH-Bestimmung nicht stört. Deshalb wurden von dem nach obigem Schema gewonnenen Plasma je nach Dosierung des N-Acetyl-L-Cystein 60 bzw. 50 µl mit 10 µl einer 21%igen bzw. 20 µl einer 10,5%igen, jeweils frisch hergestellten Metaphosphorsäure-Lösung versetzt und kühl aufbewahrt. Anschließend wurde zur Abtrennung des ausgefällten Proteins 10 Minuten bei 10.000 x g und 2° C zentrifugiert. Vom Überstand wurden 50 µl zur Bestimmung der Konzentration löslicher Thiole verwendet.

3.2.5 Durchführung der Messung

Zur Bestimmung des Gesamt-Thiolgehaltes und der Konzentration der löslichen Thiole wurde die folgende Reagenzlösung verwendet:

DTNB	2,95 mg
EDTA $2\ H_2O$	222 mg
Kaliumphosphat-Puffer	ad 100 ml

Diese Lösung ist bei Aufbewahrung im Kühlschrank über einen längeren Zeitraum haltbar und gewährleistet, daß das Reagenz in einem 2,5 bis 8-fachen Überschuß in der Reaktionslösung

vorliegt.

Für die Bestimmung wurden die nach 3.2.4.2 und 3.2.4.3 aufgearbeiteten Proben (jeweils 50 µl) mit 450 µl der oben genannten Reagenzlösung versetzt, kräftig durchmischt und 15 Minuten bei Raumtemperatur stehen gelassen. Anschließend wurden die Extinktionen der Proben in der gleichen Reihenfolge, in der die Reagenzzugabe erfolgte, in einem Spektralphotometer bei einer Wellenlänge von 412 nm gegen eine gleichbehandelte Mischung aus 50 µl EDTA-Kaliumphosphat-Puffer und 450 µl der Reagenzlösung gemessen.

Bei den pharmakokinetischen Messungen mit 0,1 mmol N-Acetyl-L-Cystein mußte die Durchführung der Messung geändert werden, weil die nach Gabe von 0,1 mmol N-Acetyl-L-Cystein/kg Körpergewicht sehr kleinen Plasmakonzentrationen der löslichen Thiole bei der geringen zur Verfügung stehenden Plasmamenge nicht mehr bestimmbar gewesen wären. Daher wurden die nach 3.1.3.4 gewonnenen Blutproben nach der Zentrifugation wie folgt aufgearbeitet: Zur Bestimmung des Gesamt-Thiolgehaltes wurden 30 µl Plasma mit 470 µl Reagenzlösung versetzt und wie oben beschrieben weiterbehandelt. Zur Bestimmung der Konzentration löslicher Thiole wurden 50 µl des nach 3.2.4.3 aufgearbeiteten Plasmas zunächst mit 50 µl einer 400 µmolaren Lösung von N-Acetyl-L-Cystein in dest. Wasser und dann mit 400 µl Reagenzlösung (DTNB 100 µmolar) versetzt, kräftig durchmischt und 15 Minuten stehen gelassen. Durch die Beifügung einer festen Menge N-Acetyl-L-Cystein gelang es, die Thiol-Werte in den meßbaren Bereich zu bringen. Die Messung erfolgte wie oben beschrieben gegen eine Mischung aus 100 µl EDTA-Kaliumphosphat-Puffer und 400 µl der Reagenzlösung ("0-Wert") sowie eine Mischung aus 50 µl EDTA-Kaliumphosphat-Puffer, 50 µl N-Acetyl-L-Cystein-Lösung 400 µmolar und 400 µl Reagenzlösung ("innerer Standard").

3.2.6 Berechnung der proteingebundenen Thiole und Auswertung

Die Auswertung der Meßergebnisse erfolgte nach Aufstellung der Eichkurven (Berechnung des Pearson-Bravaisschen Korrelationskoeffizienten und der Koeffizienten A und B der linearen Regressionsfunktion $y = A + B x$ mit einem Olivetti Tischcomputer) und Berechnen der Werte für die unbekannten Proben.
Zur Berechnung des Gehaltes an proteingebundenen -SH-Gruppen wurde für jede Probe die Differenz zwischen dem Gesamt-Thiolgehalt und der Konzentration löslicher Thiole ermittelt und der Durchschnittswert gebildet. Die Halbwertszeiten wurden bei den Gesamt-Thiolen und den proteingebundenen Thiolen auf der Basis des Anstiegs gegenüber dem Ausgangsniveau, bei den löslichen Thiolen (Ausgangswert nur ca. 0,02 mmol/l) auf der Basis des jeweils gemessenen Wertes bestimmt. Bei der Berechnung der molaren Konzentrationen von N-Acetyl-L-Cystein wurde ein Molekulargewicht von 163,2 zugrunde gelegt.

3.3 Bestimmung der Plasma - Glucose

3.3.1 Methode

Die Bestimmung der Glucosekonzentration im Plasma erfolgte mit einem automatischen Glucose-Analysator. Das Gerät mißt den bei der Oxidation von Glucose in Gegenwart von Glucose-Oxidase verbrauchten Sauerstoff mit Hilfe eines polarographischen Sauerstoffsensors. Die Sauerstoffabnahme ist der Glucosekonzentration der Probe direkt proportional.

3.3.2 Durchführung der Bestimmung

Die Blutproben wurden sofort nach Erhalt zehn Minuten bei 10.000 x g zentrifugiert. Sofern parallel zur Messung der Plasma-Glucose eine Insulinbestimmung durchgeführt wurde, wurden dafür jeweils 100 µl Plasma in ein Polystyrolgefäß einpipettiert. Diese Gläschen wurden im Gefrierschrank bei einer Temperatur von -20° C bis zum Tage der Insulinbestimmung aufbewahrt. Von dem übrigen Plasma wurden 2 x 10 µl (Doppelbestimmung) in den Glucose-Analysator einpipettiert und die Meßergebnisse direkt in mmol/l abgelesen.

3.4 Insulinbestimmung

Die Insulinkonzentration im Plasma wurde durch Radioimmunoassay (Doppelantikörpermethode nach Soeldner und Slone 1965) mit dem INSIK-Kit gemessen.

3.4.1 Eichkurven

Zur Standardisierung wurde eine Verdünnungsreihe von Rateninsulin erstellt und zusammen mit den Proben bestimmt.

3.4.1.1 Erstellung der Eichkurven

Da die spezifische Bindung des Insulins an den Antikörper durch das Medium beeinflußt wird, in diesem Falle also im Plasma geringer ist als in der Pufferlösung, mußte zur Lösung und Verdünnung des Standard-Insulins Plasma von Ratten verwendet werden. Zu diesem Zweck wurde heparinisiertes Blut von narkotisierten Ratten nach Katheterisierung der Arteria carotis gewonnen und zentrifugiert (10 Minuten, 10.000 x g, 2° C). Das erhaltene Plasma wurde zur Entfernung des

enthaltenen Insulins mit einer Kohle-Suspension (25% G/G in Pufferlösung) versetzt (0,1 ml auf 1 ml Plasma) und unter mehrfachem Umschütteln 30 Minuten in Eis aufbewahrt. Die Kohle wurde durch zweifache Zentrifugation entfernt (zunächst 20 Minuten bei 20.000 x g, 2° C, dann 10 Minuten bei 20.000 x g, 2° C). Das von Insulin frei gemachte Plasma wurde zur Herstellung der Verdünnungsreihen sowie als Leerwert verwendet. Zur Erstellung der Eichkurven wurden jeweils fünf Konzentrationen einer Verdünnungsreihe von Ratteninsulin in Dreifachbestimmung herangezogen.

3.4.1.2 Einfluß von N - Acetyl - L - Cystein auf den Verlauf der Eichkurven

In Vorversuchen wurde festgestellt, daß N-Acetyl-L-Cystein in den Konzentrationen, in denen es zum Teil in den Plasmaproben enthalten ist, den Verlauf der Eichkurve verändert (siehe Abbildung 2). Deshalb wurden für die Messungen von N-Acetyl-L-Cystein-haltigen Proben die entsprechenden Eichkurven unter Zusatz der Substanz erstellt.

3.4.2 Durchführung der Bestimmung

Der lyophilisierte Antikörper wurde laut Vorschrift gelöst. Zu den aufgetauten Proben und den Standardlösungen für die Eichkurve wurden jeweils 100 µl der Lösung dazugegeben, sorgfältig gemischt und danach 6 Stunden im Kühlschrank aufbewahrt. Nach Zugabe des gelösten ^{125}J-markierten Insulins (100 µl) inkubierte man die Proben weitere 18 Stunden im Kühlschrank.
Anschließend pipettierte man zu allen Proben 1 ml kalten Puffer und zentrifugierte 20 Minuten lang mit 4.000 Upm bei 4° C, so daß der Überstand vom Doppelantikörperkomplex dekantiert werden konnte. Eventuell am Gläschen haftende

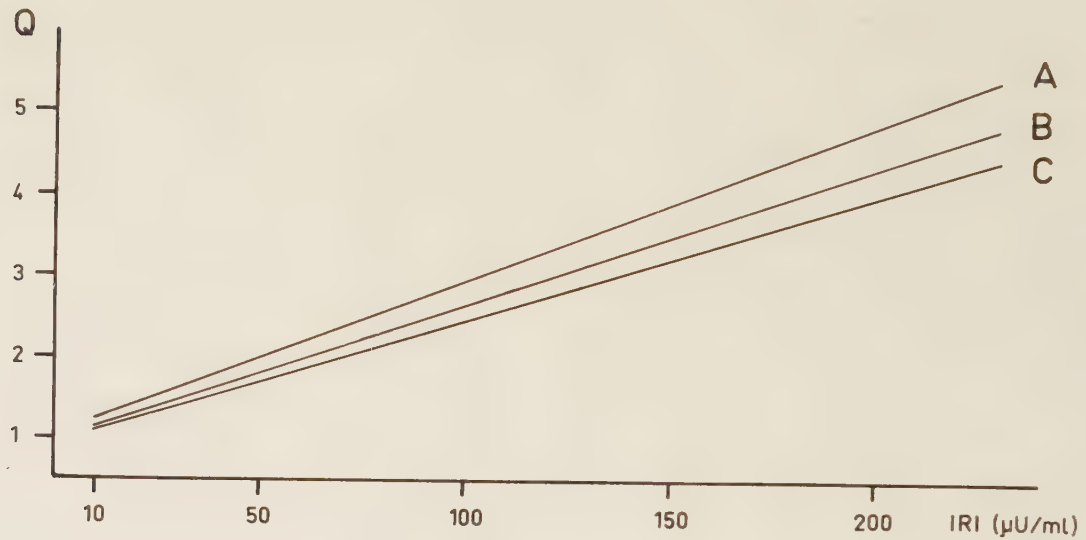


Abb. 2: Einfluß von N-Acetyl-L-Cystein (NAC) auf die Insulin-Eichkurve.
Eichkurven ohne NAC-Zusatz (A), bei Zusatz von 0,625 µmol NAC/ml (B)
und bei Zusatz von 2,5 µmol NAC/ml (C).
Q = Quotient Zählraten Leerwert/Meßwert

Tröpfchen wurden mittels einer Wasserstrahlpumpe abgesaugt. Die Proben wurden in einem automatischen Gamma-Zähler gemessen. Die Zähldauer betrug in der Regel eine Minute für jede Probe des Bestimmungsansatzes.

3.4.3 Berechnung der Insulinwerte

Der Insulingehalt der Proben, die kein N-Acetyl-L-Cystein enthielten, wurde anhand der Eichkurve errechnet, die ohne Thiol-Zusatz hergestellt worden war. Die Insulinkonzentrationen N-Acetyl-L-Cystein-haltiger Proben wurden mit Hilfe von Eichkurven, die N-Acetyl-L-Cystein in annähernd gleichen Konzentrationen wie in der Probe enthielten, bestimmt. Aus der jeweiligen Zählrate der Proben und der Zählrate des zugehörigen Leerwertes bildete man den Quotienten und konnte dann -anhand der ebenfalls auf diese Weise erstellten Eichkurve- die Insulinwerte der Proben mit einem Computerprogramm errechnen.

3.5 Versuchsauswertung

Aufgrund des teilweise unterschiedlichen Grundniveaus in verschiedenen Versuchsreihen wurden die Meßwerte gegebenenfalls als Differenz gegenüber dem Ausgangswert berechnet.
Die angegebenen Meßwerte stellen Mittelwerte $\pm$ SEM dar, errechnet aus der in Klammern aufgeführten Zahl der Versuche (n).
Für die Berechnung signifikanter Unterschiede wurde der t-Test nach Student herangezogen, wobei ein t-Test mit $p < 0{,}05$ als signifikant bewertet wurde.

4. ERGEBNISSE

4.1 Pharmakokinetik von N - Acetyl - L - Cystein

Für die vorliegende Arbeit war zunächst die Frage zu klären, welchen zeitlichen Verlauf die Thiol-Plasmaspiegel nach der intravenösen Gabe von N-Acetyl-L-Cystein nehmen. Zu diesem Zweck wurde N-Acetyl-L-Cystein in einer Dosierung von 0,1 , 0,25 und 0,3 mmol/kg Körpergewicht injiziert. Da bei den pharmakokinetischen Untersuchungen mit 0,1 mmol N-Acetyl-L-Cystein/kg Körpergewicht noch andere Parameter bestimmt wurden, werden zunächst die Ergebnisse mit 0,3 und 0,25 mmol/kg, anschließend die Ergebnisse mit 0,1 mmol/kg besprochen. Zur besseren Vergleichbarkeit der Werte bei allen drei Konzentrationen sind deswegen in den Abbildungen 3, 4, 5 und 6 die Meßpunkte als Δ gegenüber dem Ausgangsniveau dargestellt.

4.1.1 Thiol - Plasmaspiegel nach alleiniger Gabe von N - Acetyl - L - Cystein

Nach Verabreichung der beiden höheren Dosierungen ergaben sich bei den erfaßten Parametern folgende Änderungen:

Gesamt-Thiole (Abbildung 3, Tabelle 1)
Bei Gabe von 0,25 mmol N-Acetyl-L-Cystein/kg KG steigt der Plasmaspiegel der Gesamt-Thiole um 0,50 $\pm$ 0,06 mmol/l an (2 Minuten-Wert) und liegt während der gesamten Meßzeit signifikant über dem Ausgangswert von ca. 0,42 mmol/l; für die Einzelwerte ergibt sich $p < 0,05$ bis $p < 0,001$. Die Halbwertszeit der Verteilungsphase beträgt durchschnittlich 6 Minuten (0,1 Std.), anschließend (nach ca. 15 Minuten) bleiben die Gesamt-Thiole für den restlichen Meßzeitraum etwa 0,1 mmol/l über dem Ausgangsniveau. Bei Gabe von 0,3 mmol

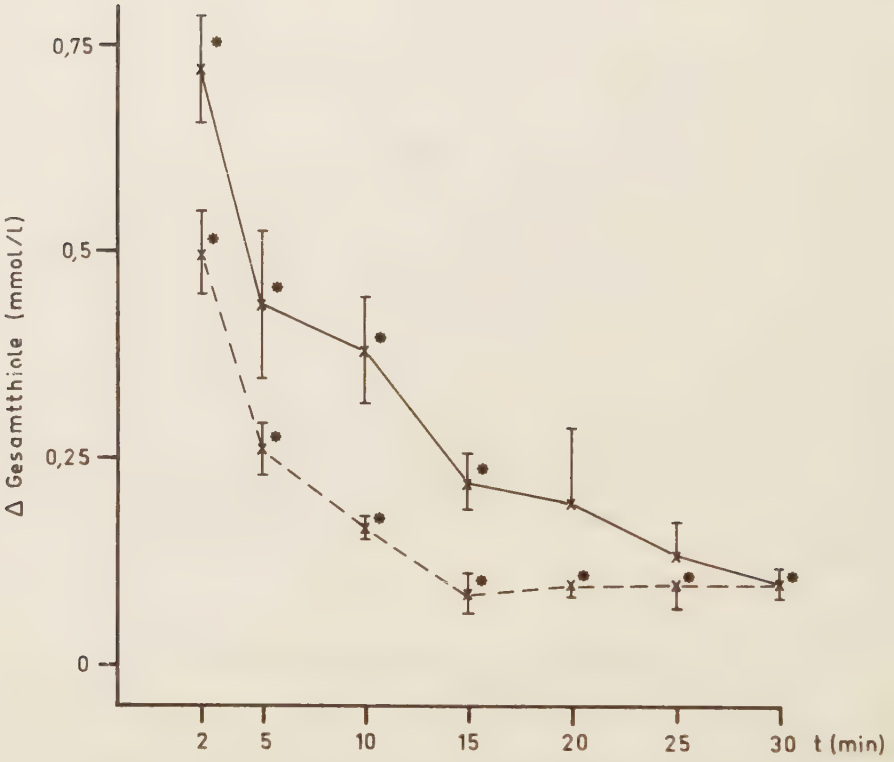


Abb. 3: Anstieg der Gesamt-Thiole im Plasma von Ratten nach i.v.-Gabe von A) 0,25 (x– – –x , n = 5) und B) 0,3 (x——x , n = 5) mmol N-Acetyl-L-Cystein/kg Körpergewicht. Ausgangswerte (mmol/l): A) 0,42 ± 0,01; B) 0,67 ± 0,06 Mittelwerte ± SEM; * = signifikant

Tabelle 1: Anstieg der Gesamt-Thiole (mmol/l) im Plasma von Ratten nach i.v.-Gabe verschiedener Dosen N-Acetyl-L-Cystein (NAC).
Ausgangswerte (mmol/l): A) 0,42 ± 0,01; B) 0,67 ± 0,06.
Mittelwerte ± SEM

Dosis NAC	Min / n	2	5	10	15	20	25	30
A 0,25 mmol /Kg KG	5	0,50 ± 0,06	0,26 ± 0,03	0,16 ± 0,02	0,09 ± 0,02	0,09 ± 0,02	0,10 ± 0,03	0,09 ± 0,02
B 0,3 mmol /Kg KG	5	0,72 ± 0,07	0,43 ± 0,09	0,38 ± 0,06	0,22 ± 0,03	0,20 ± 0,09	0,13 ± 0,04	0,09 ± 0,02

N-Acetyl-L-Cystein/kg KG steigen die Gesamt-Thiole im Plasma um 0,72 ± 0,07 mmol/l (2 Minuten-Wert) an. Aufgrund des höheren Ausgangsniveaus (ca. 0,67 mmol/l) liegen die Werte hier aber nur bis 15 Minuten nach der Verabreichung signifikant über dem Ausgangswert ($p < 0,1$ bis $p < 0,001$). Die durchschnittlichen Halbwertszeiten der beiden Eliminationsphasen sind etwa gleich, sie betragen 0,1 - 0,15 Std. Somit ergibt sich auch kein signifikanter Unterschied (5%-Niveau) zur Verteilungs-Halbwertszeit bei 0,25 mmol/kg KG. Der letzte Meßpunkt liegt ebenfalls ca. 0,1 mmol/l über dem Ausgangswert.

Lösliche Thiole (Abbildung 4, Tabelle 2)
Nach Gabe von 0,25 mmol N-Acetyl-L-Cystein/kg KG steigen die löslichen Thiole auf 0,45 ± 0,05 mmol/l an und bleiben während des gesamten Meßzeitraums signifikant über dem Ausgangswert von 0,02 bis 0,025 mmol/l ($p < 0,05$ bis $p < 0,001$). Die Halbwertszeiten der Verteilungs- und Eliminationsphase betragen 0,11 ± 0,02 Std. bzw. 0,28 ± 0,1 Std.. Zum Zeitpunkt der letzten Messung nach 30 Minuten liegen die löslichen Thiole noch 0,05 mmol/l über dem Ausgangswert. Nach Gabe von 0,3 mmol N-Acetyl-L-Cystein/kg KG ist der initiale Anstieg erwartungsgemäß größer, der 2 Minuten-Wert beträgt 0,58 ± 0,1 mmol/l. Auch hier wird der Ausgangswert (0,02 mmol/l) jederzeit signifikant überschritten ($p < 0,05$ bis $p < 0,001$). Die Halbwertszeiten liegen bei 0,2 ± 0,04 Std. (Verteilungsphase) und 0,5 ± 0,1 Std. (Eliminationsphase) und sind damit signifikant verschieden ($p < 0,05$). Die Halbwertszeit der Eliminationsphase ist auch signifikant länger als die der Eliminationsphase bei den Gesamt-Thiolen. Der 30 Minuten-Wert liegt noch 0,075 mmol/l über dem Ausgangsniveau.

Proteingebundene Thiole (Abbildung 5, Tabelle 3)
Die proteingebundenen Thiole erfahren nur geringe quantitative Änderungen. Nach 0,25 mmol N-Acetyl-L-Cystein/kg KG

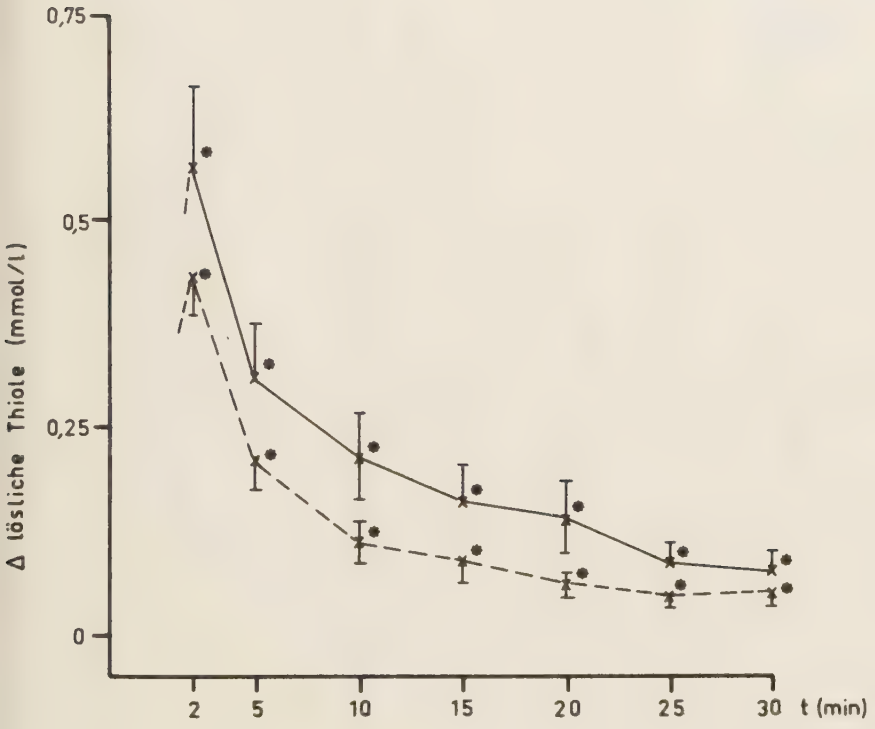


Abb.4 : Anstieg der löslichen Thiole im Plasma von Ratten nach i.v.-Gabe von A) 0,25 (x---x , n = 5) und B) 0,3 (x——x , n = 5) mmol N-Acetyl-L-Cystein/kg Körpergewicht.
Ausgangswerte (mmol/l): A) 0,02; B) 0,02
Mittelwerte ± SEM; * = signifikant

Tabelle 2: Anstieg der löslichen Thiole (mmol/l) im Plasma von Ratten nach i.v.-Gabe verschiedener Dosen N-Acetyl-L-Cystein (NAC).
Ausgangswerte (mmol/l): A) 0,02; B) 0,02.
Mittelwerte ± SEM

Dosis NAC	Min / n	2	5	10	15	20	25	30
A 0,25 mmol /Kg KG	5	0,43 ± 0,05	0,21 ± 0,03	0,11 ± 0,03	0,09 ± 0,03	0,06 ± 0,02	0,04 ± 0,02	0,05 ± 0,02
B 0,3 mmol /Kg KG	5	0,56 ± 0,1	0,31 ± 0,06	0,22 ± 0,05	0,16 ± 0,04	0,14 ± 0,05	0,09 ± 0,03	0,08 ± 0,02

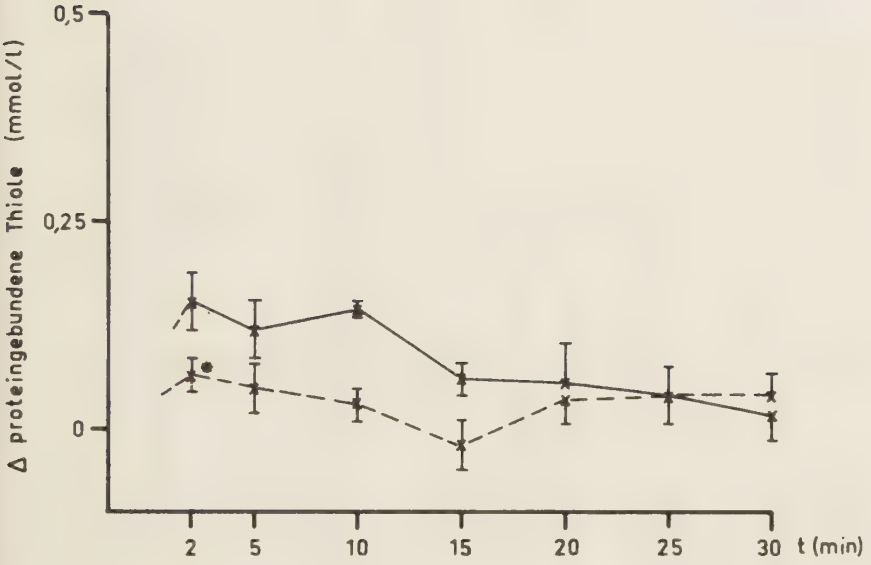


Abb. 5: Anstieg der proteingebundenen Thiole im Plasma von Ratten nach i.v.-Gabe von A) 0,25 (x---x , n = 5) und B) 0,3 (x——x , n = 5) mmol N-Acetyl-L-Cystein/kg Körpergewicht. Ausgangswerte (mmol/l): A) 0,4 ± 0,01; B) 0,65 ± 0,06 Mittelwerte ± SEM; * = signifikant

Tabelle 3: Anstieg der proteingebundenen Thiole (mmol/l) im Plasma von Ratten nach i.v.-Gabe verschiedener Dosen N-Acetyl-L-Cystein (NAC).
Ausgangswerte (mmol/l): A) 0,4 ± 0,01; B) 0,65 ± 0,06.
Mittelwerte ± SEM

Dosis NAC	Min / n	2	5	10	15	20	25	30
A 0,25 mmol /Kg KG	5	0,06 ± 0,02	0,05 ± 0,03	0,03 ± 0,02	-0,02 ± 0,03	-0,04 ± 0,02	0,04 ± 0,03	0,04 ± 0,03
B 0,3 mmol /Kg KG	5	0,16 ± 0,04	0,12 ± 0,04	0,15 ± 0,01	0,06 ± 0,02	0,06 ± 0,05	0,04 ± 0,03	0,02 ± 0,03

liegt lediglich der 2 Minuten-Wert (Δ = 0,064 $\pm$ 0,02 mmol/l) signifikant ($p < 0,05$) über dem Ausgangsniveau (0,4 $\pm$ 0,01 mmol/l). Alle übrigen Meßwerte bewegen sich nur knapp über bzw. unter dem Grundniveau, zum Zeitpunkt 30 Minuten mit einem Δ von +0,04 $\pm$ 0,026 mmol/l. Bei Gabe von 0,3 mmol N-Acetyl-L-Cystein/kg KG liegt aufgrund des höheren Ausgangsniveaus (0,65 $\pm$ 0,06 mmol/l) keiner der Werte signifikant höher als der Ausgangswert. Die initial leicht erhöhten proteingebundenen Thiole (Δ = 0,15 $\pm$ 0,04 mmol/l) sinken im Laufe der folgenden halben Stunde wieder auf das Ausgangsniveau ab.

4.1.2 Thiol - Plasmaspiegel nach Gabe von N - Acetyl - L - Cystein (0,1 mmol/kg) und Glucose

Bei den Untersuchungen mit den beiden höheren Dosen N-Acetyl-L-Cystein (siehe 4.1.1) wurde eine alleinige Gabe der Substanz vorgenommen. Dabei konnte nicht geprüft werden, ob die anschließende Glucose-Injektion die Pharmakokinetik der Thiole verändert. Deshalb wurde bei den Versuchen mit 0,1 mmol N-Acetyl-L-Cystein/kg (10 Minuten vor 0,5 g Glucose/kg) eine Parallelbestimmung der verschiedenen Thiolgruppen durchgeführt, mit folgenden Ergebnissen (Reihenfolge wie in Abschnitt 4.1.1):

Gesamt-Thiole (Abbildung 6, Tabelle 4)
Im Gegensatz zu den Versuchsreihen mit der Gabe höherer Dosen N-Acetyl-L-Cystein (siehe 4.1) liegen die Meßwerte für die Gesamt-Thiole zu keinem Zeitpunkt mehr signifikant über dem Ausgangswert, der initiale Anstieg ist mit 0,06 $\pm$ 0,01 mmol/l gering. Die Halbwertszeit der Verteilungsphase beträgt durchschnittlich 7 Minuten und unterscheidet sich damit nicht von der bei den höheren Dosen (6-9 Minuten). Die Thiol-Erhöhung ist erwartungsgemäß auch schneller wieder abgebaut, nach 25 Minuten sinken die Werte sogar unter das

Ausgangsniveau. Der 30 Minuten-Wert liegt 0,01 mmol/l darunter, der 40 Minuten-Wert 0,015 mmol/l.

Lösliche Thiole (Abbildung 6, Tabelle 4)
Die initiale Erhöhung der löslichen Thiole ist mit durchschnittlich 0,08 ± 0,01 mmol/l größer als der der Gesamt-Thiole, weil gleichzeitig der Plasmaspiegel proteingebundener Thiole (siehe unten) abnimmt. Die Meßwerte liegen bis 15 Minuten nach der Injektion von N-Acetyl-L-Cystein signifikant über dem Ausgangswert. Die Halbwertszeiten betragen im Durchschnitt 0,2 und 0,4 Stunden, ihr Unterschied ist signifikant ($p < 0,01$). Nach 25 Minuten verändert sich der Plasmaspiegel der löslichen Thiole praktisch nicht mehr, er liegt dann noch 0,02 mmol/l über dem Ausgangswert.

Proteingebundene Thiole (Abbildung 6, Tabelle 4)
Gab es bei den Versuchsreihen mit den höheren Dosen N-Acetyl-L-Cystein noch einen leichten Anstieg der proteingebundenen Thiole im Plasma (siehe Abbildung 5), so zeigt sich bei der kleinen Dosis eine Abnahme, die allerdings zu keinem Zeitpunkt signifikant ist. Die Werte für die proteingebundenen Thiole bleiben während des gesamten Meßzeitraums unter dem Ausgangsniveau, nach 40 Minuten beträgt die Abnahme 0,036 mmol/l.

Bei einer Gegenüberstellung der Verteilungs-Halbwertszeiten der drei verwendeten Dosierungen (0,1 , 0,25 und 0,3 mmol N-Acetyl-L-Cystein/kg KG) läßt sich nur in einem Fall ein signifikanter Unterschied nachweisen, und zwar bei der Verteilungs-Halbwertszeit der löslichen Thiole nach 0,25 und 0,1 mmol/kg. Da die entsprechende Halbwertszeit nach 0,3 mmol/kg aber wiederum der nach 0,1 mmol/kg gleicht, lassen sich aus der ermittelten Signifikanz keine zuverlässigen Schlüsse ziehen. Der Vergleich der Eliminations-Halbwertszeiten ergibt keine signifikanten Unterschiede. Somit gibt es auch keinerlei Hinweis darauf, daß die Glucose-Gabe die Pharmakokinetik der Plasma-Thiole nach Verabreichung von

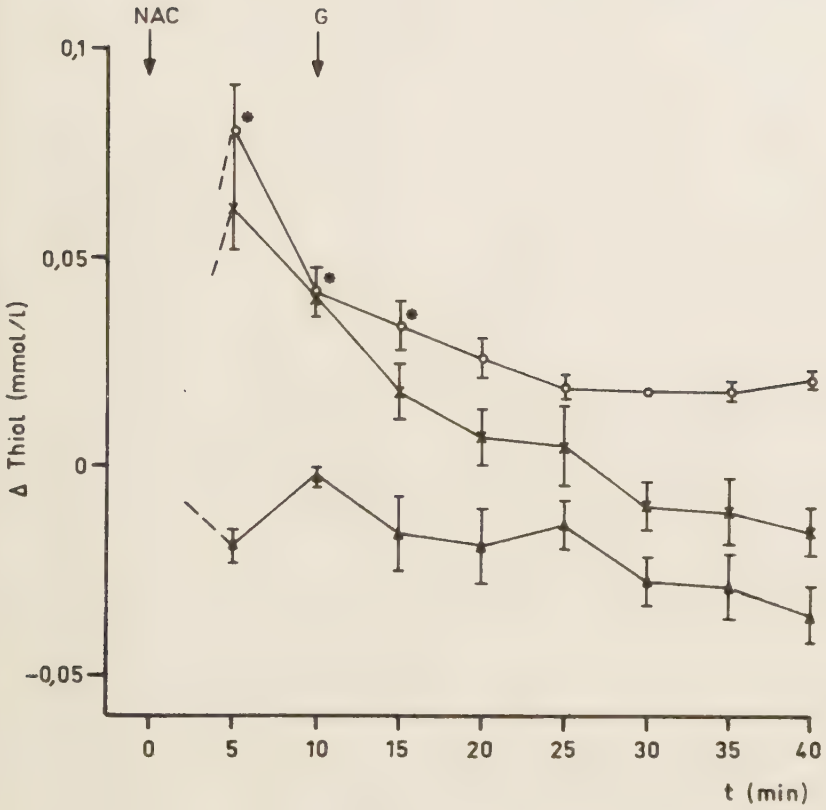


Abb. 6: Anstieg A) der Gesamt-Thiole (x——x , n = 5), B) der löslichen Thiole (O——O , n = 5) und C) der proteingebundenen Thiole (▲——▲ , n = 5) nach i.v.-Gabe von 0,1 mmol N-Acetyl-L-Cystein (NAC)/kg Körpergewicht (10 Min. vor 500 mg Glucose (G)/kg Körpergewicht).
Ausgangswerte (mmol/l): A) 0,27 ± 0,02; B) 0,03 ± 0,01; C) 0,24 ± 0,03
Mittelwerte ± SEM; * = signifikant

Tabelle 4: Anstieg bzw. Abnahme der verschiedenen Plasma-Thiole (mmol/l) bei Ratten nach i.v.-Gabe von 0,1 mmol N-Acetyl-L-Cystein/kg Körpergewicht (10 Min. vor 0,5 g Glucose/kg).
Ausgangswerte (mmol/l): A) 0,27 ± 0,02; B) 0,03 ± 0,01; C) 0,24 ± 0,03.
Mittelwerte ± SEM

	Min / n	5	10	15	20	25	30	35	40
A Thiole gesamt	5	0,06 ± 0,01	0,04 ± 0,01	0,02 ± 0,01	0,01 ± 0,01	0,01 ± 0,01	-0,01 ± 0,01	-0,01 ± 0,01	-0,02 ± 0,01
B Thiole löslich	5	0,08 ± 0,01	0,04 ± 0,01	0,03 ± 0,01	0,03 ± 0,01	0,02 ± 0,0	0,02 ± 0,0	0,02 ± 0,0	0,02 ± 0,0
C Thiole proteingebunden	5	-0,02 ± 0,0	± 0	-0,02 ± 0,01	-0,02 ± 0,01	-0,01 ± 0,01	-0,03 ± 0,01	-0,03 ± 0,01	-0,04 ± 0,01

N-Acetyl-L-Cystein verändert.

4.2 Einfluß von N - Acetyl - L - Cystein auf das Plasma - Insulin und die Insulin - Freisetzung bei Glucose - Belastung

Bei den meisten Versuchsreihen mit Bestimmungen der Plasma-Glucose (siehe 4.3) wurde eine Parallelbestimmung des Plasma-Insulins vorgenommen, um die Blutspiegelverläufe beider Parameter vergleichen zu können und eventuelle Gemeinsamkeiten bzw. Unterschiede aufzuzeigen.
Zunächst wurde bei der letzten Versuchsreihe mit der geringeren Glucose-Menge (0,25 g Glucose + 1 mmol N-Acetyl-L-Cystein/kg, siehe 4.3.1) eine Messung der Insulin-Plasmaspiegel zur groben Orientierung vorgenommen. Die Ergebnisse ermöglichten zwar keine exakten Aussagen über den Einfluß von N-Acetyl-L-Cystein auf die Insulin-Freisetzung und -Plasmaspiegel, doch legten sie die Vermutung nahe, daß N-Acetyl-L-Cystein (wie zahlreiche andere Substanzen) zu einer Erhöhung der glucoseinduzierten Insulinsekretion führt. Daher war es von Interesse, den Einfluß dieser Substanz auf Freisetzung und Plasmaspiegel des Insulins näher zu untersuchen und eine parallele Bestimmung des Plasma-Insulins auch bei den weiteren Versuchen (mit 0,5 g Glucose/kg KG) durchzuführen. Die Ergebnisse dieser Bestimmungen werden im Folgenden in der Reihenfolge der Verabreichungszeitpunkte (30, 10 und 0,5 Minuten vor Glucose) und der fallenden N-Acetyl-L-Cystein-Dosen (0,1 , 0,05 und 0,025 mmol/kg) dargestellt. Falls nicht anders angegeben, beziehen sich die Δ-Angaben im Text und die Signifikanzangaben auf die Veränderungen gegenüber dem -5 Minuten-Wert.

0,1 mmol/kg N-Acetyl-L-Cystein 30 Minuten vor Glucose 0,5 g/kg (Abbildung 7, Tabelle 5)

Wenn die Injektion von 0,1 mmol N-Acetyl-L-Cystein/kg eine halbe Stunde vor der Glucose-Gabe vorgenommen wird, die löslichen Thiole zum Zeitpunkt 0 also nur noch geringfügig erhöht sein können (siehe 4.4), ist die Insulin-Freisetzung

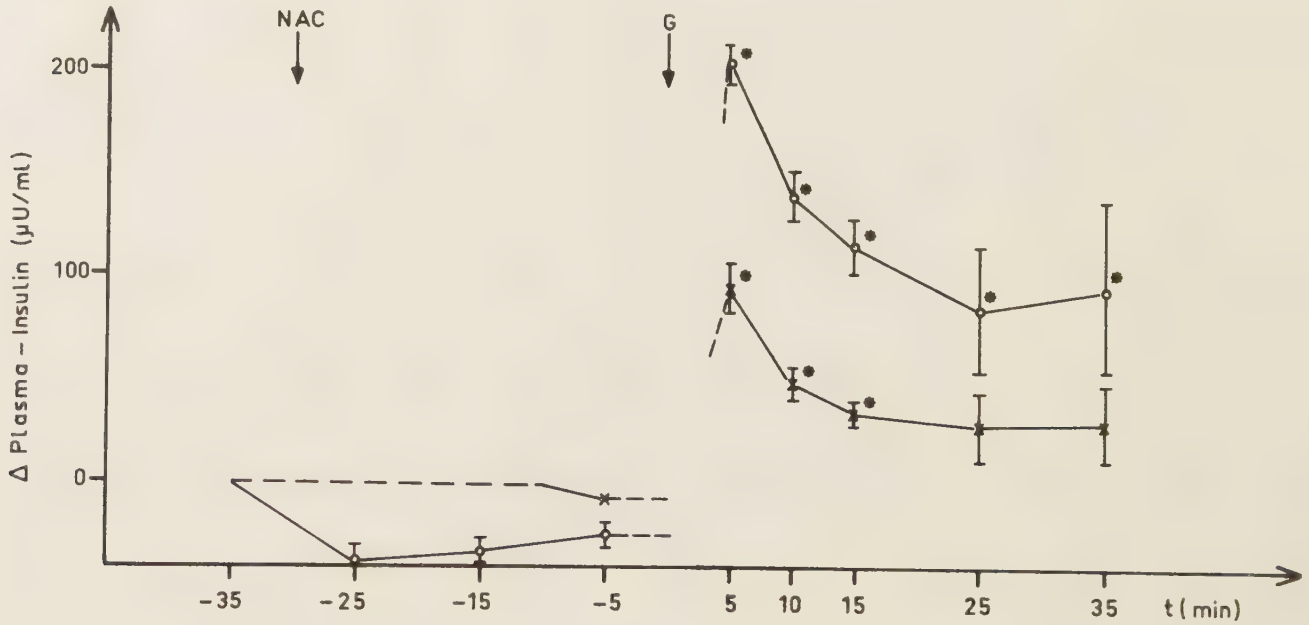


Abb. 7: Anstieg des Plasma-Insulins bei Ratten A) ohne Gabe von N-Acetyl-L-Cystein (NAC) (×——×, n = 6) sowie B) nach i.v.-Gabe von 0,1 mmol NAC/kg Körpergewicht (O——O, n = 7) 30 Minuten vor 500 mg Glucose (G)/kg Körpergewicht.

Ausgangswerte (µU/ml): A) 27 ± 4 (-10'); B) 87 ± 12 (-35')

Mittelwerte ± SEM; * = signifikant

AUC (25 Min.): A) 1974 ± 249; B) 6130 ± 430 (Unterschied signifikant, $p < 0{,}001$)

Tabelle 5: Anstieg des Plasma-Insulins (µU/ml) bei Ratten nach i.v.-Gabe von 0,1 mmol N-Acetyl-L-Cystein (NAC)/kg Körpergewicht 30 Minuten vor 500 mg Glucose/kg Körpergewicht.
Ausgangswerte (µU/ml): A) 87 ± 12 (-35'); B) 27 ± 4 (-10').
Mittelwerte ± SEM; Zeitpunkt 0 = Glucose-Gabe

	Min / n	-25	-15	-5	5	10	15	25	35
A 0,1 mmol NAC/Kg	7	-37 ± 7	-32 ± 5	-25 ± 5	206 ± 11	139 ± 12	115 ± 13	85 ± 30	96 ± 43
B NaCl - Lösung 0,9 % (1 ml/Kg)	6	--*	--*	-7 ± 3	95 ± 12	50 ± 8	36 ± 6	29 ± 16	33 ± 17

* nicht ermittelt

trotzdem erheblich größer als bei der Kontrollgruppe, das Maximum der während des Meßzeitraums (35 Minuten) monophasischen Sekretion liegt erwartungsgemäß im ersten Meßpunkt nach 5 Minuten (Δ = 206 µU/ml). Auch alle folgenden Punkte zeigen gegenüber dem Ausgangswert signifikant ($p < 0,02$) erhöhte Werte. Die AUC (25 Minuten) beträgt 6130.
Besonders auffällig an dieser Gruppe ist die Tatsache, daß die Verabreichung von N-Acetyl-L-Cystein innerhalb von nur 5 Minuten zu einer signifikanten ($p < 0,02$) Senkung des Plasma-Insulins führt. Diese Senkung ist zwar bis zur Injektion der Glucose teilweise wieder ausgeglichen, doch war sie bei vorausgegangenen Versuchsreihen unter gleichen Bedingungen nie aufgetreten.

0,1 mmol/kg N-Acetyl-L-Cystein 10 Minuten vor Glucose 0,5 g/kg (Abbildung 8, Tabelle 6)
Unter diesen Versuchsbedingungen bleiben die Insulin-Plasmaspiegel vor der Glucose-Gabe praktisch konstant. Nach der Glucose-Injektion zeigt die Versuchsgruppe eine sehr viel stärkere, biphasische Insulinsekretion mit Maxima nach 5 und 25 Minuten (Δ = 176 bzw. 168 µU/ml). Ihre Meßwerte liegen alle hochsignifikant ($p < 0,001$) über dem Ausgangsniveau, die area-under-curve (AUC) für 30 Minuten beträgt durchschnittlich 7230. Die Werte der Kontrollgruppe sind dagegen nur bis zur 20. Minute signifikant (5%-Niveau) erhöht, für die monophasische Insulin-Sekretion (Maximum nach 5 Minuten mit Δ = 95 µU/ml) ergibt sich eine durchschnittliche AUC von 2250 (statistischer Vergleich der AUC's am Ende des Kapitels).

0,1 mmol/kg N-Acetyl-L-Cystein 0,5 Minuten vor Glucose 0,5 g/kg (Abbildung 9, Tabelle 7)
Wird dieselbe Menge N-Acetyl-L-Cystein unmittelbar vor der Glucose injiziert, ergibt sich ebenfalls eine starke biphasische Sekretion von Insulin mit einem Maximum während des Meßzeitraums (Δ nach 5 Min. 231 bzw. 178 µU/ml, gemessen

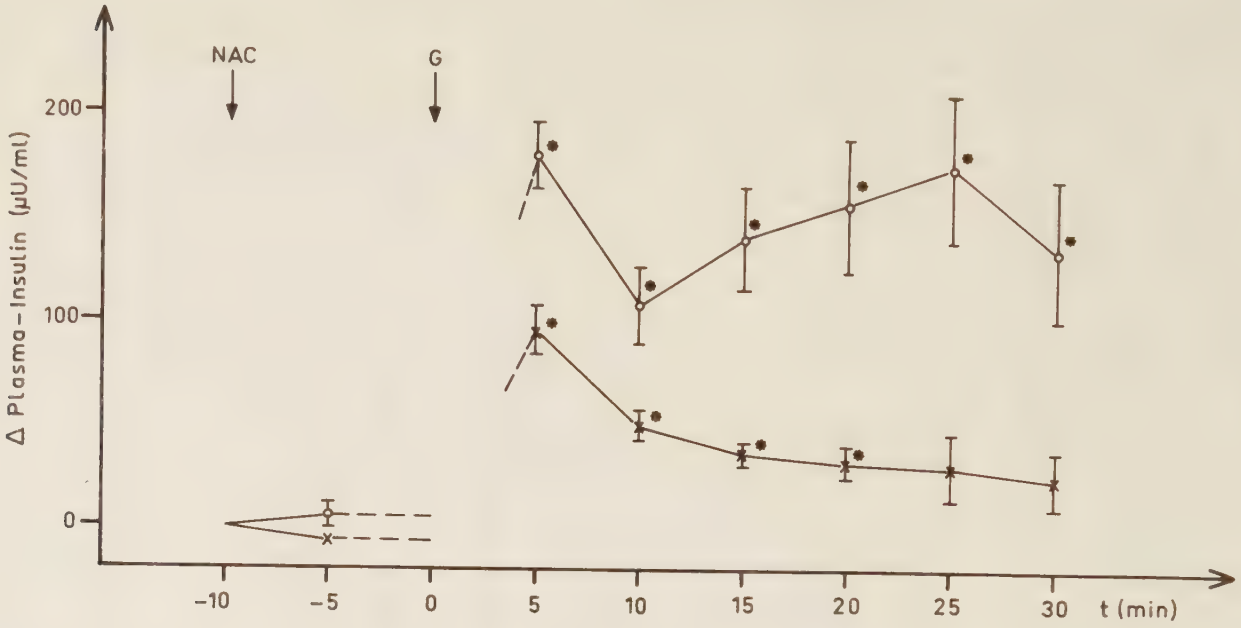


Abb. 8: Anstieg des Plasma-Insulins bei Ratten A) ohne Gabe von N-Acetyl-L-Cystein (NAC) (x——x , n = 6) sowie B) nach i.v.-Gabe von 0,1 mmol NAC/kg Körpergewicht (O——O , n = 10) 10 Minuten vor 500 mg Glucose (G)/kg Körpergewicht.

Ausgangswerte (µU/ml): A) 27 ± 4; B) 54 ± 10

Mittelwerte ± SEM; * = signifikant

AUC: A) 2254 ± 385; B) 7230 ± 993 (Unterschied signifikant, $p < 0,01$)

Tabelle 6: Anstieg des Plasma-Insulins (µU/ml) bei Ratten nach i.v.-Gabe von 0,1 mmol N-Acetyl-L-Cystein (NAC)/kg Körpergewicht 10 Minuten vor 500 mg Glucose/kg Körpergewicht.
Ausgangswerte (µU/ml): A) 54 ± 10; B) 27 ± 4.
Mittelwerte ± SEM; Zeitpunkt 0 = Glucose-Gabe

	Min / n	-5	5	10	15	20	25	30
A 0,1 mmol NAC/Kg	10	5 ± 7	181 ± 16	109 ± 17	140 ± 24	157 ± 32	173 ± 37	134 ± 34
B NaCl-Lösung 0,9 % (1 ml/Kg)	6	-7 ± 3	95 ± 12	50 ± 8	36 ± 6	32 ± 9	29 ± 16	25 ± 13

gegen den -10 bzw. -5 Minuten-Wert). Allerdings ist hier das Bild etwas verzerrt, weil noch vor der Gabe von N-Acetyl-L-Cystein eine zwar erhebliche, allerdings nicht signifikante Erhöhung des Plasma-Insulins eintritt, deren Ursache unbekannt ist. Deshalb werden zur vergleichenden Darstellung (siehe unten) die Anstiege gegenüber dem -5 Minuten-Wert herangezogen. Die signifikante Erhöhung des Plasma-Insulins gegenüber diesem Wert besteht bis zur 25. Minute; die für diese Versuchsgruppe ermittelte AUC beträgt im Mittel 6440.

0,05 mmol/kg N-Acetyl-L-Cystein 0,5 Minuten vor Glucose 0,5 g/kg (Abbildung 10, Tabelle 7)

Bei Halbierung der N-Acetyl-L-Cystein-Dosis (auf 0,05 mmol/kg) und Ausdehnung des Beobachtungszeitraums auf 40 Minuten ändert sich das Bild kaum. Die Insulinsekretion ist wiederum sehr stark erhöht mit Maxima nach 5 und 35 Minuten (Δ = 195 bzw. 152 µU/ml). Die Plasma-Insulinspiegel innerhalb dieser Reihe sind allerdings so unterschiedlich, daß sich für die Werte nach 25, 30 und 40 Minuten keine signifikante Erhöhung auf dem 5%-Niveau mehr nachweisen läßt. Die 30 Minuten-AUC hat mit 6990 ebenfalls eine ähnliche Größenordnung wie bei den bereits dargestellten Versuchsreihen.

0,025 mmol/kg N-Acetyl-L-Cystein 0,5 Minuten vor Glucose 0,5 g/kg (Abbildung 11, Tabelle 7)

Bei der letzten Variante der Versuchsbedingungen kam die kleinste N-Acetyl-L-Cystein-Dosis zum Einsatz, 0,025 mmol/kg wurden unmittelbar vor der Glucose injiziert. Die in der Folge eintretende Insulin-Sekretion unterscheidet sich in mehreren Punkten von der bei den übrigen Versuchsgruppen:

1.) Der initiale Anstieg (5 Minuten-Wert) fällt mit einem Δ von 137 µU/ml wesentlich geringer aus.

2.) Die Sekretion ist monophasisch, die Insulinwerte sind nur noch bis zur 15. Minute signifikant erhöht.

3.) Die Insulin-Werte bleiben nicht dauerhaft erhöht,

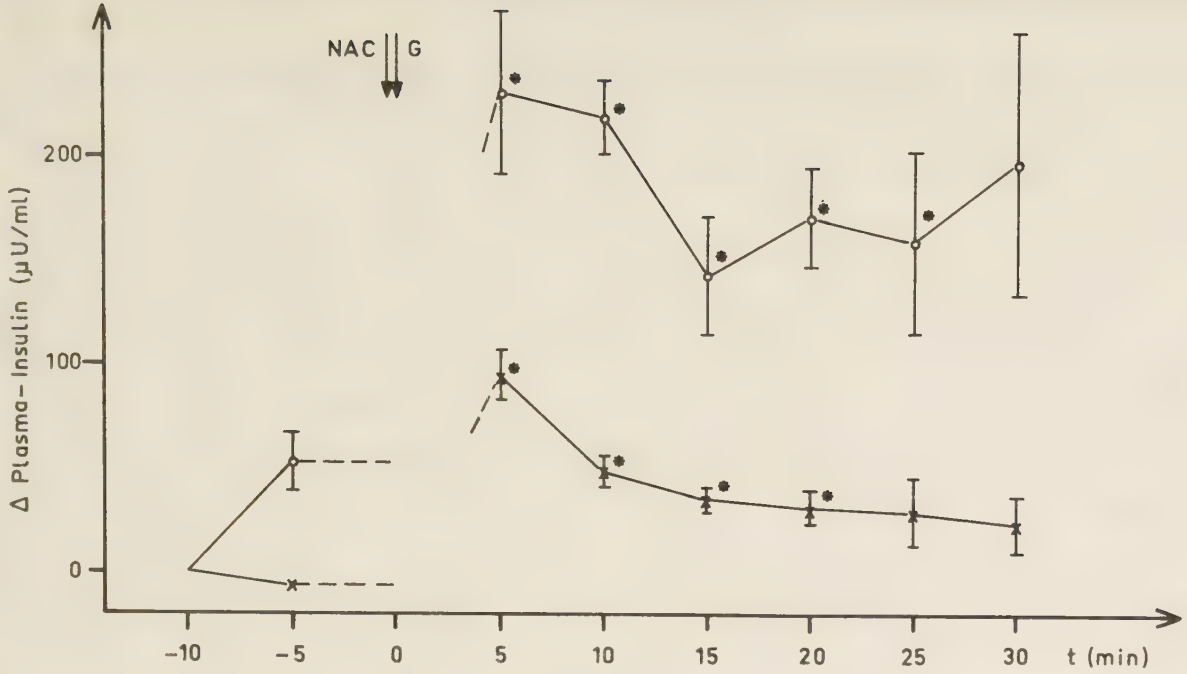


Abb.: 9: Anstieg des Plasma-Insulins bei Ratten A) ohne Gabe von N-Acetyl-L-Cystein (NAC) (x——x, n = 6) sowie B) nach i.v.-Gabe von 0,1 mmol NAC/kg Körpergewicht (O——O, n = 5) 0,5 Minuten vor 500 mg Glucose (G)/kg Körpergewicht.
Ausgangswerte (µU/ml): A) 27 ± 4; B) 45 ± 11
Mittelwerte ± SEM; * = signifikant
AUC: A) 2254 ± 385; B) 6440 ± 1695 (Unterschied signifikant; $p < 0,05$)

Tabelle 7: Anstieg des Plasma-Insulins (µU/ml) bei Ratten nach i.v.-Gabe verschiedener Dosen N-Acetyl-L-Cystein (NAC) 0,5 Minuten vor 500 mg Glucose/kg Körpergewicht.
Ausgangswerte (µU/ml): A) 45 ± 11; B) 54 ± 15; C) 46 ± 12; D) 27 ± 4.
Mittelwerte ± SEM; Zeitpunkt 0 = Glucose-Gabe

	Min / n	-5	5	10	15	20	25	30	35	40
A 0,1 mmol NAC/Kg	5	53 ± 14	231 ± 40	219 ± 17	145 ± 29	171 ± 25	160 ± 43	198 ± 64	--	--
B 0,05 mmol NAC/Kg	5	5 ± 5	195 ± 51	156 ± 28	135 ± 41	115 ± 43	135 ± 58	113 ± 46	152 ± 65	127 ± 69
C 0,025 mmol NAC/Kg	4	11 ± 4	148 ± 6	129 ± 17	89 ± 15	76 ± 27	34 ± 13	21 ± 14	19 ± 15	20 ± 16
D NaCl-Lösung 0,9 % (1ml/Kg)	6	-7 ± 3	95 ± 12	50 ± 8	36 ± 6	32 ± 9	29 ± 16	25 ± 13	33 ± 17	15 ± 10

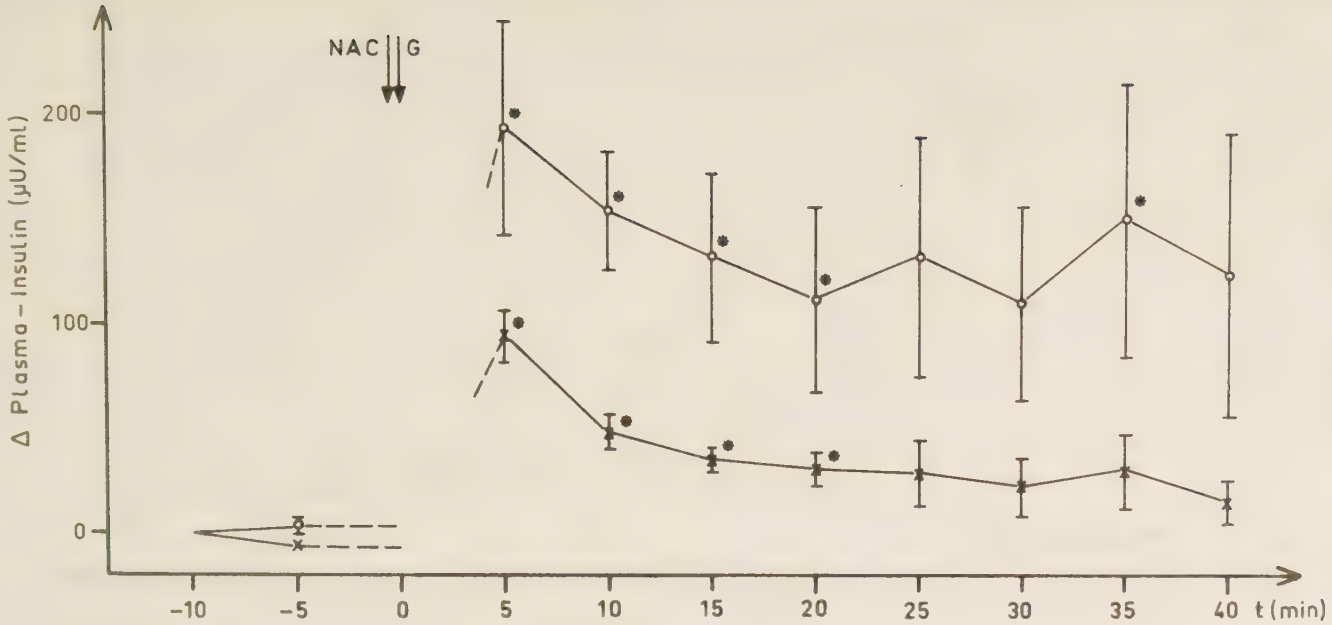


Abb. 10: Anstieg des Plasma-Insulins bei Ratten A) ohne Gabe von N-Acetyl-L-Cystein (NAC) (×——×, n = 6) sowie B) nach i.v.-Gabe von 0,05 mmol NAC/kg Körpergewicht (O——O, n = 5) 0,5 Minuten vor 500 mg Glucose (G)/kg Körpergewicht.

Ausgangswerte (µU/ml): A) 27 ± 4; B) 54 ± 15

Mittelwerte ± SEM; * = signifikant

AUC: A) 2254 ± 385; B) 6988 ± 1699 (Unterschied signifikant, $p < 0,02$)

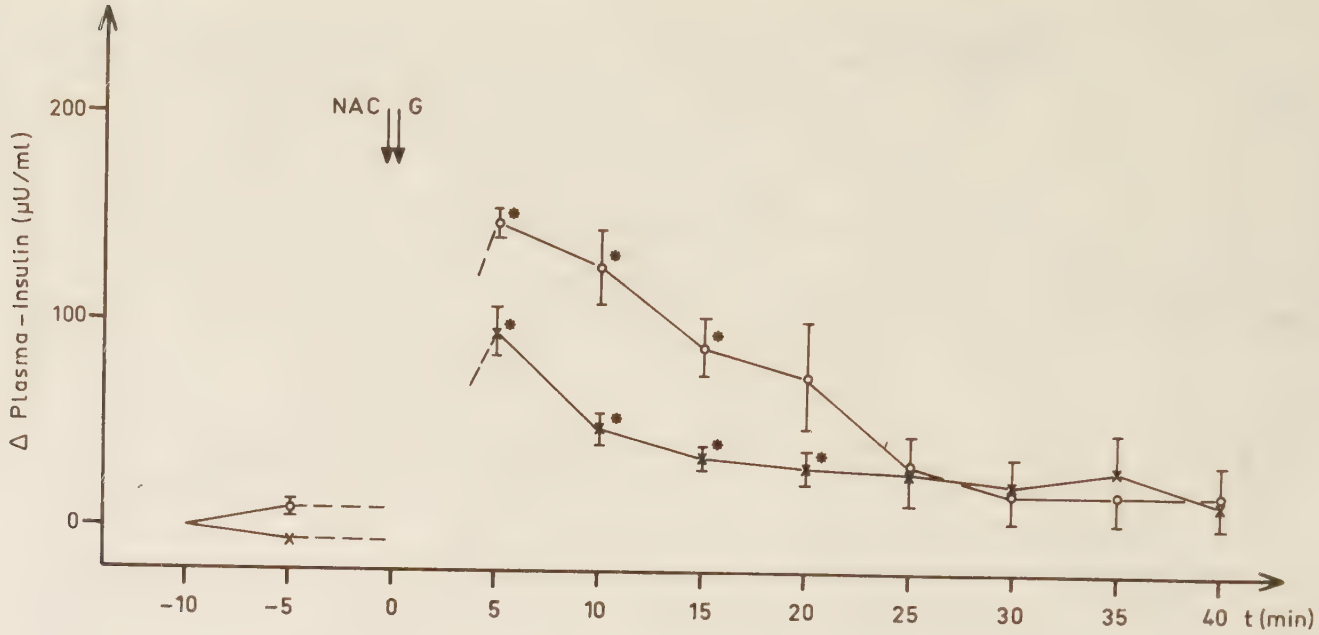


Abb. 11: Anstieg des Plasma-Insulins bei Ratten A) ohne Gabe von N-Acetyl-L-Cystein (NAC) (x——x, n = 6) sowie B) nach i.v.-Gabe von 0,025 mmol NAC/kg Körpergewicht (O——O, n = 4) 0,5 Minuten vor 500 mg Glucose (G)/kg Körpergewicht.

Ausgangswerte (µU/ml): A) 27 ± 4; B) 46 ± 12

Mittelwerte ± SEM; * = signifikant

AUC: A) 2254 ± 385; B) 3854 ± 580 (Unterschied signifikant, $p < 0,05$)

sondern sinken innerhalb des Meßzeitraums konstant ab, so daß sie ähnlich der Kontrollgruppe nach 40 Minuten nur noch unbedeutend (10 µU/ml) über dem Ausgangswert liegen.

4.) Die AUC (30 Minuten) ist mit durchschnittlich 3850 erheblich niedriger.

Vergleich der Versuchsreihen

Der Vergleich der für die verschiedenen Gruppen ermittelten Werte ist beim Insulin schwieriger als bei der Glucose, weil sich das Plasma-Insulin teilweise schon vor der Glucose-Injektion erheblich verändert. Daher wird der initiale Anstieg des Plasma-Insulins nach dem Glucose-Bolus hier nur für die Versuchsreihen verglichen, bei denen N-Acetyl-L-Cystein unmittelbar (0,5 Minuten) vor der Glucose gegeben wurde, so daß die Basiswerte für den Anstieg noch nicht durch N-Acetyl-L-Cystein beeinflußt sein können (NAC = N-Acetyl-L-Cystein):

		Δ Insulin nach 5 Min. (µU/ml)
0,1 mmol/kg NAC	0,5 Minuten vor Glucose 0,5 g/kg	178 ± 47
0,05 mmol/kg NAC		192 ± 52
0,025 mmol/kg NAC		137 ± 5
Kontrolle (0,9% NaCl)		102 ± 12

Man kann erkennen, daß der initiale Anstieg des Plasma-Insulins bei den Versuchsreihen mit N-Acetyl-L-Cystein in jedem Fall größer ist, wenngleich eine Signifikanz auf dem 5%-Niveau (z. T. wegen der hohen Standardabweichung) nicht nachgewiesen werden kann. Der maximale Initial-Effekt des N-Acetyl-L-Cystein zeigt sich bei einer Dosis von 0,05 mmol/kg.

Unter den am Anfang dieses Abschnitts genannten Voraussetzungen lassen sich auch die Kurvenverläufe dieser 4 Gruppen

vergleichen. In der Abbildung 12 sind daher deren Insulin-Plasmaspiegel bis zur 30. Minute zum besseren Vergleich noch einmal auf der Basis des gegenüber dem -5 Minuten-Wert dargestellt. Es ist deutlich zu erkennen, daß die Insulin-Plasmaspiegel nach 0,1 und 0,05 mmol N-Acetyl-L-Cystein/kg dauerhaft hoch bleiben, während sich der Kurvenverlauf nach 0,025 mmol/kg eher dem der Kontrollgruppe nähert.

Zur Wertung der Ergebnisse aller in diesem Abschnitt beschriebenen Versuchsreihen bietet sich auch die area under curve (AUC) an. Eine Gegenüberstellung der dafür ermittelten Werte ergibt folgendes Bild (NAC = N-Acetyl-L-Cystein, G = Glucose):

			AUC 30 Min.
A	0,1 mmol/kg NAC	30 Min. vor G	6130 ± 430*
B	0,1 mmol/kg NAC	10 Min. vor G	7230 ± 993
C	0,1 mmol/kg NAC	0,5 Min. vor G	6440 ± 1695
D	0,05 mmol/kg NAC	0,5 Min. vor G	6988 ± 1699
E	0,025 mmol/kg NAC	0,5 Min. vor G	3854 ± 580
F	Kontrolle (0,9 % NaCl	10 Min. vor G)	2254 ± 385
			1974 ± 249*

* AUC 25 Minuten

Aus dem statistischen Vergleich der Gruppen resultiert (n.s. = nicht signifikant, $p > 0,05$):

A*/F*	$p < 0,001$	C/E	n.s.
B/C	n.s.	C/F	$p < 0,05$
B/D	n.s.	D/E	n.s.
B/E	n.s.	D/F	$p < 0,02$
B/F	$p < 0,01$	E/F	$p < 0,05$
C/D	n.s.		

Es zeigt sich, daß die AUCs aller Versuchsgruppen signifikant größer sind als die der Kontrollgruppe, sich untereinander aber nicht signifikant unterscheiden. Der maximale

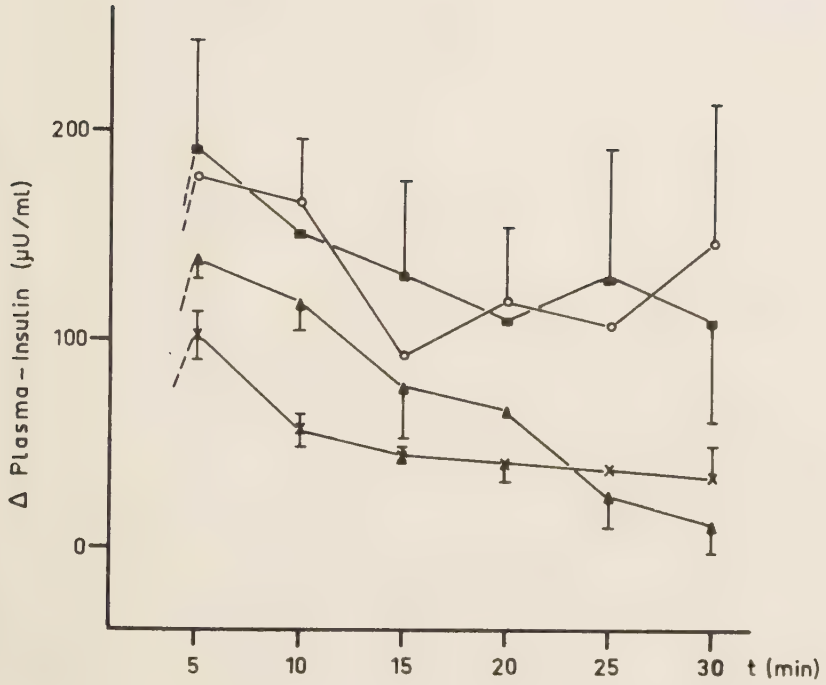
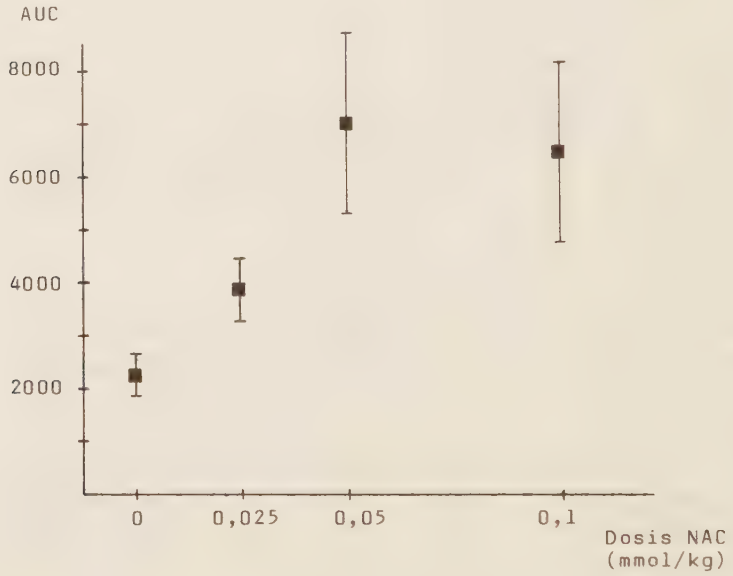


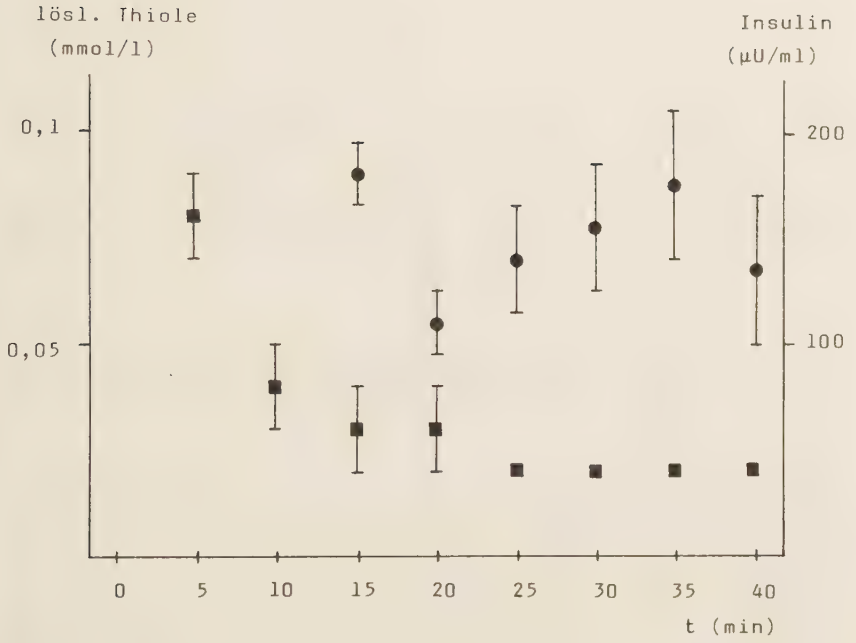
Abb. 12: Anstieg des Plasma-Insulins bei Ratten (gegenüber dem -5 Minuten-Wert) ohne Gabe von N-Acetyl-L-Cystein (NAC) (x——x, n = 6) sowie nach i.v.-Gabe von 0,1 (O——O, n = 5), 0,05 (■——■, n = 5) und 0,025 (▲——▲, n = 4) mmol NAC/kg Körpergewicht 0,5 Minuten vor 500 mg Glucose/kg Körpergewicht.
Mittelwerte ± SEM

Effekt des N-Acetyl-L-Cystein zeigt sich in den Versuchsreihen B und D. Trägt man für die Versuchsreihen C, D, E und F die AUCs gegen die entsprechenden N-Acetyl-L-Cystein-Dosierungen auf, ergibt sich folgende Grafik:



Eine derartige Dosis/Wirkungskurve auf der Basis der AUCs wurde auch bei in vitro - Versuchen mit N-Acetyl-L-Cystein in unserem Arbeitskreis gefunden (Enz und Hehl, persönliche Mitteilung).

Aus der Gegenüberstellung der Plasma-Insulinspiegel und der korrespondierenden Plasmakonzentrationen löslicher Thiole für die verschiedenen Versuchsreihen ergibt sich eine weitere Auswertungsmöglichkeit, in der folgenden Grafik beispielhaft anhand der Werte aus der Versuchsreihe B dargestellt (● = Insulin-Spiegel, ■ = Thiol-Spiegel):



Thiol-Gabe bei 0 Min., Glucose-Gabe bei 10 Min.

Die Grafik zeigt, daß die Insulinsekretion trotz absinkender Thiol-Spiegel stark erhöht bleibt, also offenbar nicht von einer gleichzeitigen Erhöhung der löslichen Plasma-Thiole abhängig ist.

4.3 Einfluß von N - Acetyl - L - Cystein auf die Plasma - Glucose

Um festzustellen, ob und wie die Gabe von N-Acetyl-L-Cystein die Glucosespiegel im Plasma vor und nach der intravenösen Glucosegabe (als Bolus) beeinflußt, wurden den Versuchstieren unterschiedliche Mengen N-Acetyl-L-Cystein zu unterschiedlichen Zeiten vor der Gabe unterschiedlicher Mengen Glucose verabreicht.

4.3.1 Einfluß von N - Acetyl - L - Cystein auf die Plasma - Glucose bei Gabe von 250 mg Glucose/kg

Bei diesen Versuchen wurden 0,3 mmol bzw. 1 mmol N-Acetyl-L-Cystein/kg Körpergewicht 10 Minuten vor der Glucose intravenös verabreicht. Wie die Abbildung 13 und die Tabelle 8 zeigen, tritt nach der Gabe von N-Acetyl-L-Cystein noch vor der Glucose-Verabreichung eine leichte Erhöhung der Plasma-Glucose ein. Diese Erhöhung ist allerdings in keinem Fall signifikant, für die Meßwerte unmittelbar vor der Glucose-Gabe gilt $p < 0,2$ bis $p < 0,5$. Der anschließende Glucose-Bolus läßt die Plasma-Glucose erwartungsgemäß stark ansteigen, wobei keine signifikanten Unterschiede zwischen den drei Versuchsreihen feststellbar sind. Für die einzelnen Kurven liegen der erste Meßwert wie auch die weiteren Meßergebnisse signifikant ($p < 0,05$) über dem Ausgangswert bei -0,5 Minuten, und zwar bei 250 mg Glucose/kg KG bis 15 Minuten, bei 250 mg Glucose + 0,3 mmol N-Acetyl-L-Cystein/kg KG bis 20 Minuten und bei 250 mg Glucose + 1 mmol N-Acetyl-L-Cystein/kg KG bis 10 Minuten nach der Glucose-Gabe. Alle weiteren Meßwerte (bis 60 Minuten nach Glucose-Injektion) sind nicht mehr signifikant (5%-Niveau) höher als das Grundniveau.

Zur Beurteilung der Geschwindigkeit der Glucose-Elimination dient der K-Wert, für den sich folgende Werte ergeben:

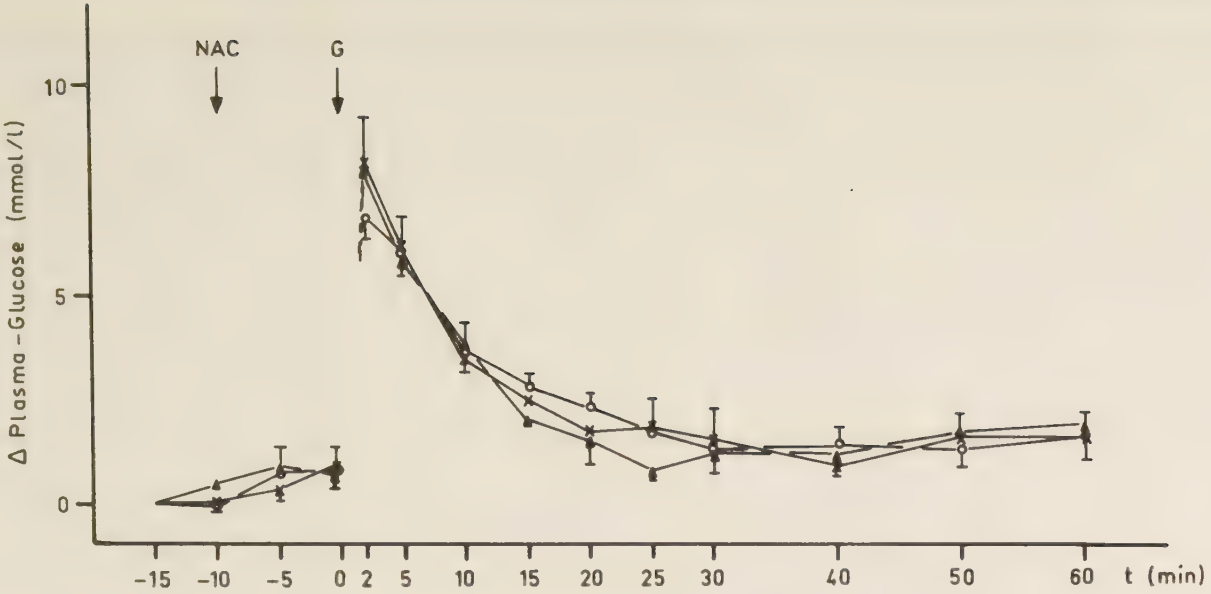


Abb. 13: Anstieg der Plasma-Glucose bei Ratten A) ohne Gabe von N-Acetyl-l-Cystein (NAC) (×——×) sowie nach i.v.-Gabe von B) 0,3 (O—— O) und C) 1,0 (▲—— ▲) mmol NAC(kg Körpergewicht 10 Minuten vor 250 mg Glucose (G)/kg Körpergewicht

Ausgangswerte (mmol/l): A) 6,5 ± 0,1; B) 6,6 ± 0,1; C) 7,3 ± 0,8

Mittelwerte ± SEM; jeweils n = 4; Signifikanzangaben im Text

K-Werte: A) 2,66 ± 0,18; B) 1,92 ± 0,21; C) 2,24 ± 0,21 (Unterschiede nicht signifikant)

Minuten	Dosis NAC (mmol/Kg)		
	0 A	0,3 B	1,0 C
n	4	4	4
-10	0,1 ± 0,3	0,0 ± 0,2	0,5 ± 0,2
-5	0,4 ± 0,3	0,8 ± 0,6	0,9 ± 0,4
-0,5	1,1 ± 0,5	0,9 ± 0,5	0,8 ± 0,3
2	8,2 ± 1,1	6,9 ± 0,5	8,0 ± 0,6
5	6,2 ± 0,7	6,1 ± 0,4	5,9 ± 0,4
10	3,6 ± 0,4	3,8 ± 0,4	3,9 ± 0,5
15	2,6 ± 0,6	2,9 ± 0,3	2,1 ± 0,1
20	1,8 ± 0,8	2,4 ± 0,3	1,6 ± 0,2
25	1,9 ± 0,7	1,8 ± 0,4	0,9 ± 0,3
30	1,6 ± 0,8	1,4 ± 0,3	1,3 ± 0,4
40	1,0 ± 0,4	1,5 ± 0,4	1,3 ± 0,4
50	1,7 ± 0,6	1,4 ± 0,4	1,8 ± 0,4
60	1,7 ± 0,6	1,7 ± 0,6	2,0 ± 0,2

		K-Wert 30 Min.
0,3 mmol/kg NAC	10 Minuten vor 250 mg Glucose/kg	1,92 ± 0,21
1,0 mmol/kg NAC		2,24 ± 0,21
Kontrolle (0,9% NaCl)		2.66 ± 0,18

NAC = N-Acetyl-L-Cystein

Damit ist der K-Wert für 250 mg Glucose + 0,3 mmol N-Acetyl-L-Cystein/kg KG bereits signifikant niedriger ($p < 0,05$) als der der Kontrollgruppe. Schließlich sei noch darauf hingewiesen, daß die Plasma-Glucose bei allen drei Versuchsreihen zwischen der 30. und der 60. Minute nach Glucose-Gabe nur noch geringe Änderungen erfährt: Die nach 30 Minuten abgenommenen Proben liegen 0,5 - 0,8 mmol/l, die nach 60 Minuten abgenommenen 0,9 - 1,1 mmol/l über den Ausgangswerten (-0,5 Minuten). Ein zusätzlicher statistischer Vergleich zeigt außerdem, daß sich nach der Glucose-Injektion die zeitgleichen Meßwerte der drei Versuchsreihen in keinem einzigen Fall signifikant unterscheiden. Somit ist unter diesen Versuchsbedingungen kein Einfluß von N-Acetyl-L-Cystein auf die Glucose-Elimination aus dem Plasma zu erkennen.

Tabelle 8 (Seite 74): Anstieg der Plasma-Glucose (mmol/l) bei Ratten nach i.v.-Gabe verschiedener Dosen N-Acetyl-L-Cystein (NAC) 10 Minuten vor 250 mg Glucose/kg Körpergewicht
Ausgangswerte -15' (mmol/l): A) 6,5 ± 0,1; B) 6,6 ± 0,1; C) 7,3 ± 0,8.
Mittelwerte ± SEM; Zeitpunkt 0 = Glucose-Gabe

4.3.2 Einfluß von N - Acetyl - L - Cystein auf die Plasma - Glucose bei Gabe von 500 mg Glucose/kg

Im Rahmen der Untersuchungen mit N-Acetyl-L-Cystein und 500 mg Glucose/kg Körpergewicht wurden Versuchsreihen mit verschiedenen Variationen von N-Acetyl-L-Cystein-Dosis und Verabreichungszeit durchgeführt. Dabei wurden folgende Varianten untersucht:

N-Acetyl-L-Cystein Dosierung	Verabreichungszeitpunkt	
0,1 mmol/kg	30 Minuten vor	0,5 g Glucose/kg
0,1 mmol/kg	10 Minuten vor	
0,1 mmol/kg	0,5 Minuten vor	
0,05 mmol/kg	0,5 Minuten vor	
0,025 mmol/kg	0,5 Minuten vor	

Die Behandlung der Kontrolltiere (mit physiologischer Natriumchloridlösung) wurde bereits in Abschnitt 3.1.3.1 besprochen. Die Darstellung der Ergebnisse erfolgt in derselben Reihenfolge wie in Kapitel 4.2. Die Δ-Angaben beziehen sich auf die Veränderungen gegenüber dem Ausgangswert bei -10 Minuten, die Signifikanzangaben auf den Wert bei -5 Minuten.

0,1 mmol/kg N-Acetyl-L-Cystein 30 Minuten vor Glucose 0,5 g/kg (Abbildung 14, Tabelle 9)

In dieser Versuchsreihe wurde geprüft, ob die Geschwindigkeit der Glucose-Elimination mit einer Verabreichung von N-Acetyl-L-Cystein 30 Minuten vor der Glucose erhöht werden könnte. Unter diesen Bedingungen ergab sich vor der Glucose-Gabe über 30 Minuten keinerlei auffallende Veränderung der Plasma-Glucose. Nach dem Glucose-Bolus findet sich der Anstieg mit 10,9 ± 0,3 mmol/l in demselben Bereich wie bei den

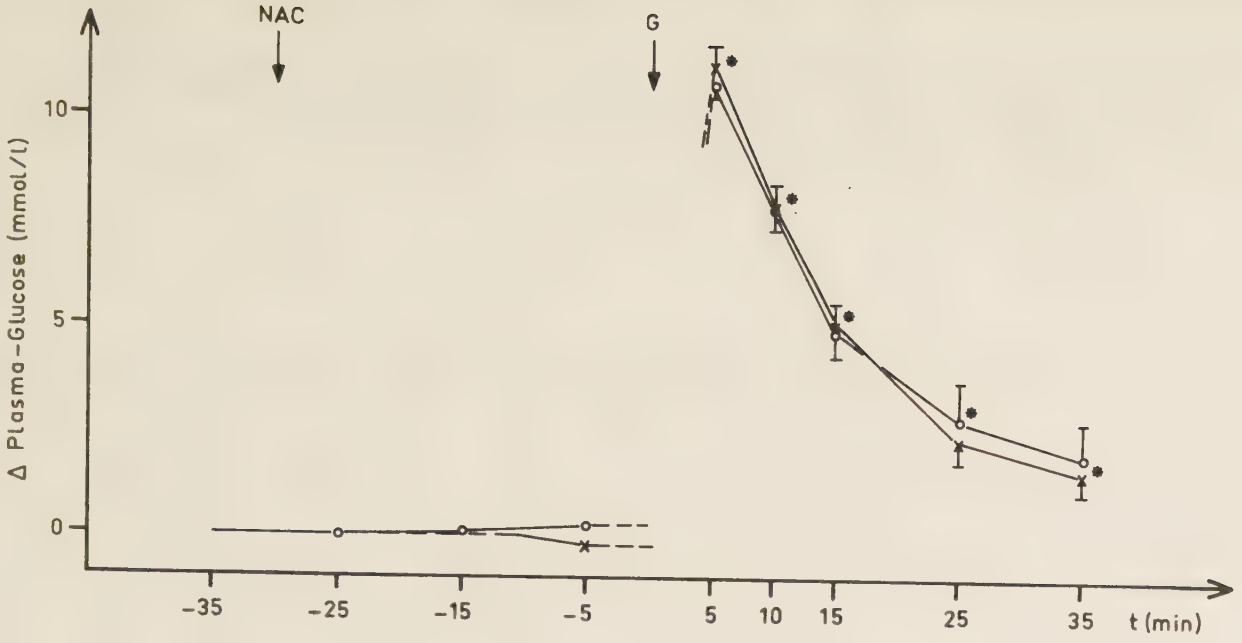


Abb. 14: Anstieg der Plasma-Glucose bei Ratten A) ohne Gabe von N-Acetyl-L-Cystein (NAC) (x——x , n = 6) sowie B) nach i.v.-Gabe von 0,1 mmol NAC/kg Körpergewicht (O——O , n = 7) 30 Minuten vor 500 mg Glucose (G)/kg Körpergewicht.
Ausgangswerte (mmol/l): A) 6,2 ± 0,4 (-10'); B) 7,6 ± 0,15 (-35')
Mittelwerte ± SEM; * = signifikant

Tabelle 9: Anstieg der Plasma-Glucose (mmol/l) bei Ratten nach i.v.-Gabe von 0,1 mmol N-Acetyl-L-Cystein (NAC)/kg Körpergewicht 30 Minuten vor 500 mg Glucose/kg Körpergewicht.
Ausgangswerte (mmol/l): A) 7,6 ± 0,15 (-35'); B) 6,2 ± 0,4 (-10').
Mittelwerte ± SEM; Zeitpunkt 0 = Glucose-Gabe

	n / Min	-25	-15	-5	5	10	15	25	35
A 0,1 mmol NAC/Kg	7	0,0 ± 0,1	0,1 ± 0,1	0,3 ± 0,1	10,9 ± 0,3	7,9 ± 0,5	5,0 ± 0,7	2,9 ± 1,0	2,0 ± 0,9
B NaCl - Lösung 0,9 % (1 ml/Kg)	6	--*	--*	-0,2 ± 0,1	11,4 ± 0,4	8,0 ± 0,5	5,2 ± 0,5	2,4 ± 0,6	1,6 ± 0,5

* nicht ermittelt

übrigen Versuchsgruppen, die festgestellten Meßwerte liegen noch bis zur 25. Minute signifikant (5%-Niveau) über dem Basiswert. Der bis zu diesem Meßzeitpunkt ermittelte K-Wert ist mit 2,4 ± 0,25 relativ niedrig. Wie bei den folgenden Versuchsreihen wird auch bei dieser die initiale Erhöhung der Plasma-Glucose während des Meßzeitraums nicht vollständig abgebaut, nach 35 Minuten beträgt die Erhöhung zum Grundwert noch durchschnittlich 2,0 mmol/l.

0,1 mmol/kg N-Acetyl-L-Cystein 10 Minuten vor Glucose 0,5 g/kg (Abbildung 15, Tabelle 10)

Hierbei wurde eine Versuchsanordnung gewählt, bei der man nach den vorausgegangenen pharmakokinetischen Untersuchungen davon ausgehen konnte, daß zum Zeitpunkt der Glucose-Gabe die Verteilungsphase der Thiole sich im Abschluß befindet, d.h., alle Thiol-Verteilungsräume jenseits des Plasmas bis zum Gleichgewicht aufgefüllt sind und somit die Thiole auch im Gewebe zur Verfügung stehen.

Die Injektion von N-Acetyl-L-Cystein verändert die Plasma-Glucose überhaupt nicht. Erst die anschließende Glucose-Injektion läßt die Plasma-Glucose stark ansteigen (Δ = 11,4 ± 0,8 mmol/l), die folgenden Meßwerte liegen alle signifikant ($p < 0,001$) über dem Ausgangswert. Der K-Wert als Maß für die Geschwindigkeit der Glucose-Elimination aus dem Plasma liegt mit durchschnittlich 2,8 ± 0,25 zwar um Einiges niedriger als die Kontrollgruppe (K = 3,4 ± 0,35), doch ist der Unterschied nicht signifikant. Der niedrigere K-Wert läßt sich vor allem darauf zurückführen, daß etwa die Hälfte des untersuchten N-Acetyl-L-Cystein-Kollektivs nach der 20. Minute in einer Art "rebound-Phänomen" wieder ansteigende Glucosewerte zeigt. Dadurch bedingt wird bei der letzten Probe auch ein hohes Δ zum Basiswert gefunden (3,9 mmol/l, gegenüber 1,8 mmol/l bei der Vergleichsgruppe).

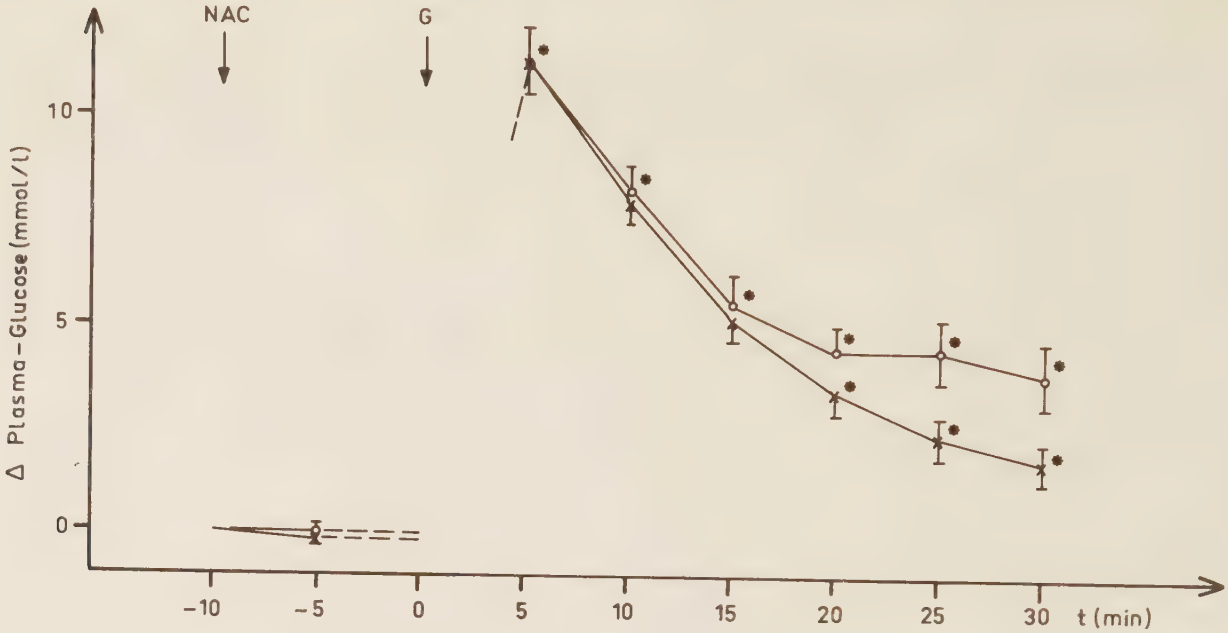


Abb. 15: Anstieg der Plasma-Glucose bei Ratten A) ohne Gabe von N-Acetyl-L-Cystein (NAC) (x——x , n = 6) sowie B) nach i.v-Gabe von 0,1 mmol NAC/kg Körpergewicht (O——O , n = 10) 10 Minuten vor 500 mg Glucose (G)/kg Körpergewicht.
Ausgangswerte (mmol/l): A) 7,25 ± 0,2; B) 6,2 ± 0,4
Mittelwerte ± SEM; * = signifikant
K-Werte: A) 3,4 ± 0,35; B) 2,8 ± 0,25 (Unterschied nicht signifikant)

Tabelle 10: Anstieg der Plasma-Glucose (mmol/l) bei Ratten nach i.v.-Gabe von 0,1 mmol N-Acetyl-L-Cystein (NAC)/kg Körpergewicht 10 Minuten vor 500 mg Glucose/kg Körpergewicht.
Ausgangswerte (mmol/l): A) 7,25 ± 0,2; B) 6,2 ± 0,4.
Mittelwerte ± SEM; Zeitpunkt 0 = Glucose-Gabe

	Min / n	-5	5	10	15	20	25	30
A 0,1 mmol NAC/Kg	10	0,0 ± 0,2	11,4 ± 0,8	8,3 ± 0,6	5,6 ± 0,7	4,5 ± 0,6	4,5 ± 0,8	3,9 ± 0,8
B NaCl-Lösung 0,9 % (1ml/Kg)	6	-0,2 ± 0,1	11,4 ± 0,4	8,0 ± 0,5	5,2 ± 0,5	3,5 ± 0,6	2,4 ± 0,6	1,8 ± 0,5

0,1 mmol/kg N-Acetyl-L-Cystein 0,5 Minuten vor Glucose 0,5 g/kg (Abbildung 16, Tabelle 11)

Wird dieselbe Menge N-Acetyl-L-Cystein unmittelbar vor der Glucose-Gabe injiziert, ist der initiale Glucose-Anstieg praktisch gleich (Δ = 11,1 $\pm$ 0,6 mmol/l). Bis auf den 25 Minuten-Meßwert liegen alle Werte signifikant ($p < 0,05$) über dem Grundniveau. Der K-Wert beträgt 3,65 $\pm$ 0,29, ist damit allerdings nur unbedeutend höher als die Kontrolle mit 3,4 $\pm$ 0,35 und auch nicht signifikant verschieden. Auch bei dieser Versuchsreihe tritt das im vorigen Abschnitt beschriebene "rebound-Phänomen" mit ansteigenden Glucosewerten in der Spätphase ein, allerdings erst nach 25 Minuten; nach 30 Minuten beträgt das Δ zum Grundwert noch 2,4 mmol/l.

0,05 mmol/kg N-Acetyl-L-Cystein 0,5 Minuten vor Glucose 0,5 g/kg (Abbildung 16, Tabelle 11)

Halbiert man die N-Acetyl-L-Cystein-Dosis auf 0,05 mmol/kg und behält den Verabreichungszeitpunkt bei, fällt der Glucose-Wert 5 Minuten nach der Glucose-Belastung nur wenig höher aus (Δ = 11,6 $\pm$ 0,8 mmol/l). Aufgrund der hohen SEM läßt sich für die ermittelten Meßwerte nur bis zur 20. Minute eine signifikante (5%-Niveau) Steigerung gegenüber dem Ausgangsniveau nachweisen. Mit 3,4 $\pm$ 0,48 ist der K-Wert identisch mit dem der Kontrolle, eine Signifikanzangabe erübrigt sich. Zwischen der 35. und der 40. Minute (verlängerter Beobachtungszeitraum) steigt die Plasma-Glucose bei dieser Versuchsreihe ebenfalls wieder leicht an, der letzte Meßpunkt zeigt ein Δ von 2,1 mmol/l zum Ausgangswert.

0,025 mmol/kg N-Acetyl-L-Cystein 0,5 Minuten vor Glucose 0,5 g/kg (Abbildung 16, Tabelle 11)

In der letzten Versuchsreihe dieses Abschnitts wurde die N-Acetyl-L-Cystein-Dosis noch einmal reduziert (auf 0,025 mmol/kg) und wiederum unmittelbar vor der Glucose verabreicht. Hierbei zeigte sich ein gegenüber den vergleichbaren Versuchsgruppen stark verringerter initialer Anstieg der

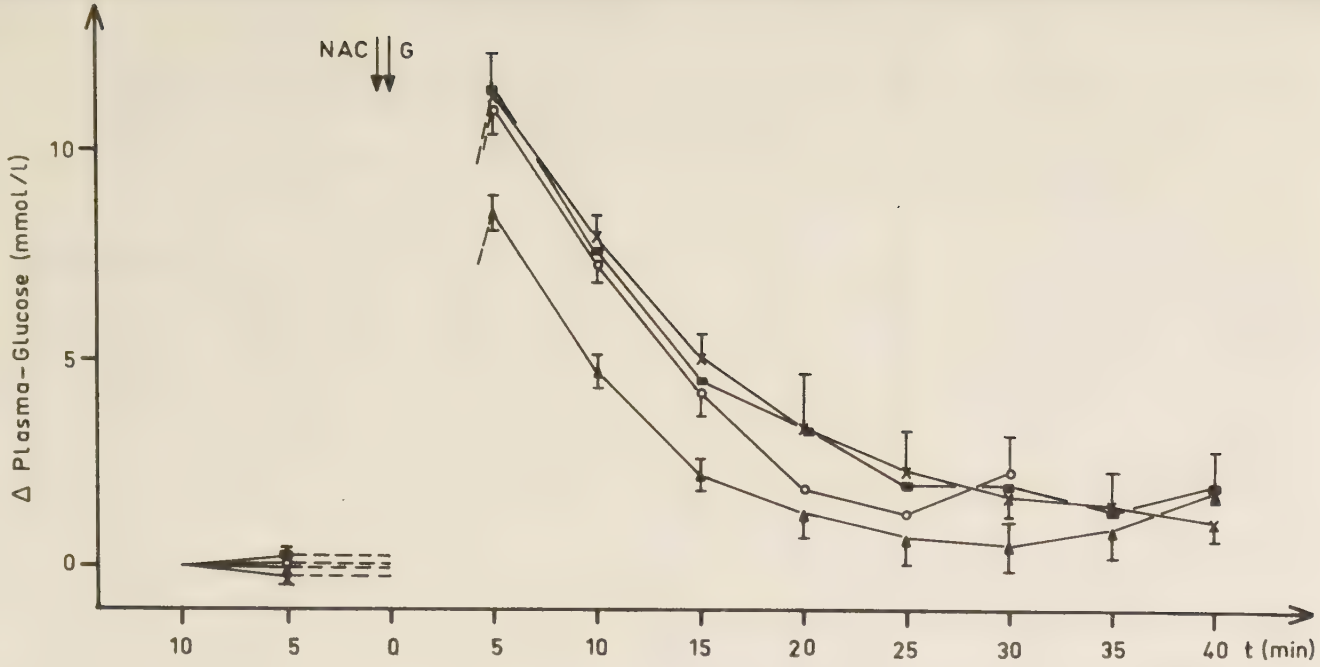


Abb. 16: Anstieg der Plasma-Glucose bei Ratten A) ohne Gabe von N-Acetyl-L-Cystein (NAC) (×——×, n = 6) sowie nach i.v.-Gabe von B) 0,1 (○——○, n = 5), C) 0,05 (■——■, n = 5) und D) 0,025 (▲——▲, n = 5) mmol NAC/kg Körpergewicht 0,5 Minuten vor 500 mg Glucose (G)/kg Körpergewicht.
Ausgangswerte (mmol/l): A) 6,2 ± 0,4; B) 7,6 ± 0,25; C) 7,0 ± 0,3; D) 8,0 ± 0,2
Mittelwerte ± SEM; Signifikanzangaben im Text
K-Werte: A) 3,4 ± 0,35; B) 3,65 ± 0,29; C) 3,4 ± 0,48; D) 3,0 ± 0,27 (Unterschiede nicht signifikant)

Tabelle 11: Anstieg der Plasma-Glucose (mmol/l) bei Ratten nach i.v.-Gabe verschiedener Dosen N-Acetyl-L-Cystein (NAC) 0,5 Minuten vor 500 mg Glucose/kg Körpergewicht.
Ausgangswerte (mmol/l): A) 7,6 ± 0,25; B) 7,0 ± 0,3; C) 8,0 ± 0,2; D) 6,2 ± 0,4.
Mittelwerte ± SEM; Zeitpunkt 0 = Glucose-Gabe

	Min / n	-5	5	10	15	20	25	30	35	40
A 0,1 mmol NAC/Kg	5	0,1 ± 0,2	11,1 ± 0,6	7,4 ± 0,5	4,3 ± 0,6	2,0 ± 0,5	1,4 ± 0,7	2,4 ± 0,9	--	--
B 0,05 mmol NAC/Kg	5	0,25 ± 0,2	11,6 ± 0,9	7,7 ± 1,0	4,6 ± 1,0	3,5 ± 1,3	2,1 ± 1,3	2,1 ± 1,3	1,5 ± 0,9	2,1 ± 0,8
C 0,025 mmol NAC/Kg	5	0,0 ± 0,1	8,6 ± 0,4	4,8 ± 0,4	2,3 ± 0,4	1,4 ± 0,6	0,8 ± 0,7	0,6 ± 0,6	1,0 ± 0,7	1,9 ± 1,0
D NaCl-Lösung 0,9 % (1ml/Kg)	6	-0,2 ± 0,1	11,4 ± 0,4	8,0 ± 0,5	5,2 ± 0,5	3,5 ± 0,6	2,4 ± 0,6	1,8 ± 0,5	1,6 ± 0,5	1,2 ± 0,5

Plasma-Glucose nach der Glucose-Injektion (Δ = 8,6 $\pm$ 0,4 mmol/l; Auswertung siehe unten). Die Meßwerte liegen auch nur noch über 15 Minuten signifikant ($p < 0,05$) über dem Ausgangswert. Beim K-Wert (3,0 $\pm$ 0,27) ergibt sich kein nennenswerter Unterschied zu den übrigen Versuchsreihen, allerdings ist die initiale Erhöhung der Plasma-Glucose nach 30 Minuten bis auf 0,6 mmol/l abgebaut. Anschließend steigen die Werte wieder leicht an, bis zur 40. Minute um 1,3 mmol/l.

Vergleich der Versuchsreihen

Vergleicht man diese Versuchsreihen auf der Basis des Anstiegs der Plasma-Glucose nach der Bolus-Injektion (5 Minuten-Wert) und der K-Werte, ergibt sich folgendes Bild (NAC = N-Acetyl-L-Cystein, G = Glucose):

		Δ Glucose mmol/l	K-Wert 30 Min.
0,1 mmol/kg NAC	30 Min. vor G	10,9 $\pm$ 0,3	*2,4 $\pm$ 0,25
0,1 mmol/kg NAC	10 Min. vor G	11,4 $\pm$ 0,8	2,8 $\pm$ 0,25
0,1 mmol/kg NAC	0,5 Min. vor G	11,1 $\pm$ 0,6	3,6 $\pm$ 0,29
0,05 mmol/kg NAC	0,5 Min. vor G	11,6 $\pm$ 0,8	3,4 $\pm$ 0,48
0,025 mmol/kg NAC	0,5 Min. vor G	8,6 $\pm$ 0,4	3,0 $\pm$ 0,27
Kontrolle (0,9% NaCl	10 Min. vor G)	11,4 $\pm$ 0,4	3,4 $\pm$ 0,35

* K-Wert 25 Minuten

Der statistische Vergleich der aufgeführten Werte für den Glucose-Anstieg ergibt, daß die Erhöhung der Plasma-Glucose nach Gabe von 0,025 mmol N-Acetyl-L-Cystein/kg 0,5 Minuten vor Glucose 0,5 g/kg signifikant geringer ist als bei allen anderen Versuchsreihen ($p < 0,05$ bis $p < 0,002$), die auch untereinander keinerlei signifikante Unterschiede aufweisen. Dasselbe gilt auf dem 5%-Niveau auch für die Meßwerte nach 10 und 15 Minuten. Erst ab der 20. Minute ändert sich das

Bild: Der Glucose-Wert nach 0,025 mmol N-Acetyl-L-Cystein unterscheidet sich nicht mehr von allen anderen Versuchsgruppen signifikant. Die Unterschiede der übrigen Versuchsreihen untereinander bleiben mit zwei Ausnahmen in allen Punkten nicht signifikant.

Werden die ermittelten K-Werte (30 Minuten) einander gegenübergestellt, zeigt sich in keinem Fall ein signifikanter Unterschied.

Die Berechnung der Glucose/Insulin-ratio, also des Quotienten aus Glucose und Insulin, für die Mittelwerte aller Meßpunkte nach der Glucose-Gabe bei den oben genannten Versuchsreihen führt zu folgendem Ergebnis (NAC = N-Acetyl-L-Cystein, G = Glucose):

			Bereich $\frac{\text{Glucose}}{\text{Insulin}}$-ratio (mmol x ml/µU x l)
A	0,1 mmol/kg NAC	30 Min. vor G	0,057-0,021
B	0,1 mmol/kg NAC	10 Min. vor G	0,076-0,026
C	0,1 mmol/kg NAC	0,5 Min. vor G	0,048-0,009
D	0,05 mmol/kg NAC	0,5 Min. vor G	0,059-0,010
E	0,025 mmol/kg NAC	0,5 Min. vor G	0,095-0,018
F	Kontrolle (0,9% NaCl	10 Min. vor G)	0,160-0,049

Zeitraum: A) 5-35 Min.; B) und C) 5-30 Min.; D), E) und F) 5-40 Min.

Eine Betrachtung der ermittelten Werte zeigt, daß die Glucose/Insulin-ratio bei allen Versuchsreihen mit N-Acetyl-L-Cystein um 41-70 % (Obergrenze) bzw. 47-81 % (Untergrenze) niedriger liegt als bei der Kontrollgruppe. Dies bedeutet, daß bei etwa gleichem Anstieg der Plasma-Glucose (siehe oben) erheblich mehr Insulin freigesetzt wird, wenn bei den Versuchen N-Acetyl-L-Cystein eingesetzt wird. Diese erhöhte Insulinfreisetzung und die erniedrigte Glucose/Insulin-ratio korrelieren aber nicht mit einer beschleunigten Glucose-

Elimination aus dem Plasma, wie aus den oben aufgeführten K-Werten zu erkennen ist.

Unter den vorgenannten Versuchsbedingungen ist mithin zwar eine starke Erniedrigung der Glucose/Insulin-ratio, aber keine nennenswerte Veränderung der Glucose-Elimination aus dem Plasma durch N-Acetyl-L-Cystein festzustellen.

5. DISKUSSION

5.1 Intravenös verabreichtes N - Acetyl - L - Cystein und Plasma - Thiole

Die Pharmakokinetik und der Metabolismus von N-Acetyl-L-Cystein waren bereits Gegenstand mehrerer Untersuchungen an verschiedenen Tierspezies und am Menschen (Sheffner, 1965; Sheffner et al., 1966; Lorber et al., 1970; Fawell, 1976; Rodenstein et al., 1978; Bonamomi und Gazzaniga, 1980; Maddock, 1980). Dabei stand allerdings meist die orale Gabe und die Gewebeverteilung der Substanz im Vordergrund, weniger der Effekt auf die Plasma-Thiole. Lediglich Bonamomi und Gazzaniga (1980) untersuchten den Konzentrationsverlauf nach intravenöser Gabe von (radioaktiv markiertem) N-Acetyl-L-Cystein bei Ratten, und zwar in einer Dosierung von 50 mg/kg (dies entspricht ca. 0,3 mmol/kg). Dabei zeigte sich, daß nach einer Verteilungsphase von ca. 30 Minuten die Blutspiegel des radioaktiven ^{35}S über einen Zeitraum von Stunden konstant blieben. Es muß allerdings beachtet werden, daß damit naturgemäß noch nichts über die Verbindungen gesagt werden kann, deren Bestandteil der radioaktive Schwefel ist, da es sich um Thiole, Disulfide, etc. handeln kann.
In der vorliegenden Arbeit wurde N-Acetyl-L-Cystein in Dosierungen von 0,1 , 0,25 und 0,3 mmol/kg intravenös verabreicht. Betrachtet man zunächst den Effekt dieser Dosen auf die Gesamt-Thiole im Plasma der Ratten, so zeigt sich bei den beiden höheren Dosen eine zwar teilweise ungleichmäßige, doch konstante Abnahme der Gesamt-Thiole. Interessanterweise zeigen beide Versuchsgruppen nach 30 Minuten das gleiche Niveau, das gegenüber dem Ausgangswert noch leicht erhöht ist. Allerdings wird dieses Niveau bei 0,25 mmol N-Acetyl-L-Cystein/kg bereits nach einer Viertelstunde erreicht, bei der höchsten Konzentration erst nach einer halben Stunde. Diese Ergebnisse deuten darauf hin, daß bei den gewählten

Dosen die Elimination der SH-Gruppen aus dem Plasma in etwa mit der gleichen Geschwindigkeit erfolgt. Für die nach 15 Minuten gleichbleibenden Gesamt-Thiole bei 0,25 mmol/kg könnten Rückverteilungsphänomene aus anderen Kompartimenten verantwortlich sein, in Übereinstimmung mit den von Bonamomi und Gazzaniga (1980) erhobenen Befunden. Unklar bleibt, warum die Ausgangswerte bei den beiden höheren Dosen so unterschiedlich sind.
Etwas anders zeigt sich das Bild bei der niedrigsten N-Acetyl-L-Cystein-Konzentration (0,1 mmol/kg). Hier sinken die Gesamt-Thiole innerhalb einer halben Stunde sogar unter das Ausgangsniveau ab, ein Trend, der sich in dem bei diesen Versuchen verlängerten Beobachtungszeitraum auch fortsetzt. Auch bei dieser Konzentration ist die Geschwindigkeit der SH-Elimination aus dem Plasma unverändert; im Gegensatz zu den höheren Dosen scheinen aber Rückverteilungsphänomene keine Rolle mehr zu spielen. Auch ein Einfluß der angeschlossenen Glucose-Gabe auf den Verlauf der Gesamt-Thiole im Plasma ist nicht zu erkennen.

Bei den löslichen Plasma-Thiolen sind die Befunde bei den drei Dosierungen sehr ähnlich. Die Ausgangswerte entsprechen weitgehend den von Melien (1984) bei seinen Untersuchungen mit GSH ermittelten Werten. Die Plasmakurven der beiden höheren Dosierungen zeigen eine parallele, gleichmäßige Abnahme bis zu einem wiederum noch leicht erhöhten Niveau nach einer halben Stunde. Auch die Ergebnisse nach 0,1 mmol/kg dokumentieren eine gleichmäßige Abnahme bis zu einem leicht erhöhten Niveau, das quantitativ allerdings wesentlich geringer als bei den hohen Dosen ausfällt. Diskussionsfähige Unterschiede bei der Eliminationsgeschwindigkeit können auch hier nicht festgestellt werden.

Die größten Unterschiede bei den drei verabreichten Dosierungen sind bei den proteingebundenen Thiolen im Plasma festzustellen, denn hier zeigt sich A) bei 0,3 mmol/kg eine

deutliche Erhöhung, B) bei 0,25 mmol/kg eine leichte Erhöhung und C) bei 0,1 mmol/kg eine deutliche Senkung der proteingebundenen Plasma-Thiole. Da frühere Untersuchungen (Sheffner, 1965; Fawell, 1976; Bonamomi und Gazzaniga, 1980) ergeben haben, daß N-Acetyl-L-Cystein relativ schnell in neu synthetisiertes Protein eingebaut werden kann bzw. mittels labiler Disulfidbrücken an Organproteine gebunden wird, ergäbe sich daraus eine mögliche Erklärung für A) und B) dahingehend, daß die Elimination des unveränderten bzw. deacetylierten N-Acetyl-L-Cystein aus dem Plasma nicht nur auf dem Wege der Verteilung in andere Kompartimente, sondern auch durch raschen Einbau in Plasmaproteine erfolgt. Dabei darf jedoch nicht übersehen werden, daß sich ein derartiger Effekt bei den getesteten Dosierungen in einem quantitativ äußerst geringen Rahmen bewegt, wie aus Kapitel 4. zu ersehen ist.
Die "Reaktion" der proteingebundenen Thiole auf die Verabreichung von 0,1 mmol/kg N-Acetyl-L-Cystein mit anschließender Glucose-Gabe ist völlig anders, denn hier ergibt sich eine zweimalige Senkung der proteingebundenen Plasma-Thiole, zunächst nach der Injektion der Substanz, dann erneut nach intravenöser Verabreichung der Glucose. Wie dieses Phänomen zustandekommt, kann nach dem derzeitigen Kenntnissstand über N-Acetyl-L-Cystein und Plasma-Thiole nicht erklärt werden, deshalb wäre eine Diskussion an dieser Stelle rein spekulativ.

Die oben diskutierten Befunde über die Thiol-Plasmaspiegel nach intravenöser Gabe von verschiedenen Dosen N-Acetyl-L-Cystein decken sich in den Punkten, wo überhaupt Untersuchungen existieren, mit den Befunden aus früheren Prüfungen. Allerdings ergeben sich deutliche Unterschiede zu den Befunden von Melien (1984), der nach intravenöser Verabreichung verschiedener Dosen GSH an Ratten eine Messung der GSH-Thiolgruppen und der löslichen Thiole insgesamt (sowie des GSSG) durchführte und dabei eine wesentlich stärkere

Steigerung der löslichen Thiole im Plasma feststellte. Das Verhältnis der reduzierten zur oxidierten Form des Glutathions, das durch den GSH/GSSG-Quotienten ausgedrückt wird, konnte aber durch keine der verwendeten GSH-Dosen (0,05 - 0,3 mmol/kg) gesteigert werden, sondern nahm im Verlauf der Versuche mit unterschiedlicher Geschwindigkeit ab.
Darüberhinaus ergaben sich -dem Ziel dieser pharmakokinetischen Untersuchungen entsprechend- zum zeitlichen Verlauf der Plasma-Thiolspiegel wichtige Erkenntnisse, die eine differenziertere und damit bessere Festlegung der Versuchsbedingungen für die anschließenden Untersuchungen mit N-Acetyl-L-Cystein- und Glucose-Verabreichung ermöglichten.

5.2 Insulinotrope Wirkungen

5.2.1 Insulinfreisetzung durch Thiole

Nachdem verschiedene Arbeitsgruppen festgestellt hatten, daß mit Thiol-Reagenzien eine Insulin-Freisetzung erzielt werden kann (Bloom et al., 1972; Hellman et al., 1973 a/b; Landgraf-Leurs et al., 1978), ergab sich in der Folge auch die Frage, welche Effekte dann mit exogenen Thiolen zu erreichen wären. Bei den Untersuchungen zu dieser Frage stellte sich heraus, daß exogene Thiole die Insulinsekretion nicht hemmen, sondern offensichtlich unter bestimmten Bedingungen selbst stimulieren. Hellman und Mitarbeiter (1975) konnten an der Pankreasinsel der Dickmaus zeigen, daß die durch 10 mM Glucose induzierte Freisetzung von Insulin durch 1-Thio-D-Glucose oder reduziertes Glutathion (beides 0,1 mmolar) potenziert wird. Dies ließ sich auch mit an Dextran gebundenem L-Cystein erreichen. Allerdings war keines der drei Thiole in der Lage, die Insulinsekretion in Abwesenheit von Glucose zu stimulieren, eine Tatsache, die einen deutlichen Unterschied zu den Thiol-Reagenzien aufzeigt. Ein derartiger Befund wurde später auch mit Dithiothreitol 0,1 mmolar und 1 mmolar am perfundierten Pankreas erhoben (Landgraf-Leurs et al., 1978). Die Arbeitsgruppe um Landgraf-Leurs fand aber im Gegensatz zu den Untersuchungen von Hellman keine Potenzierung, sondern eine Hemmung der mit 20 mM Glucose induzierten Insulinfreisetzung durch Dithiothreitol.

Die Untersuchungen von Abdel-Hamid (1983), ebenfalls am perfundierten Pankreas, ergaben keine Stimulation der Insulinsekretion bei alleiniger Anwesenheit des entsprechenden Thiols (GSH, L-Cystein). Wurde gleichzeitig Glucose eingesetzt, konnte eine erhöhte Insulin-Freisetzung festgestellt werden. Auch an der isolierten Pankreasinsel der Ratte konnte die durch Glycerinaldehyd, Glucose, Tolbutamid oder Leucin induzierte Insulinsekretion mit Hilfe von GSH erhöht

werden. Dagegen ließ sich die durch Glucagon, Isoprenalin oder db-cAMP hervorgerufene Insulinfreisetzung mit GSH nicht weiter steigern (Abdel-Hamid, 1983).

Aus den oben genannten, bisher vorliegenden Untersuchungsergebnissen ergibt sich kein klares Bild darüber, wie exogene Thiole die Prozesse bei der Insulin-Freisetzung modulieren. Ganz offensichtlich sind aber exogene Thiole allein nicht in der Lage, eine erhöhte Insulinsekretion zu bewirken, sondern können ihren Effekt nur über einen zweiten Wirkstoff wie z.B. Glucose ausüben. Umgekehrt gibt es nach diesen Untersuchungen aber auch einige Wirkstoffe, deren positive Effekte auf die Insulinfreisetzung erst durch den gleichzeitigen Einsatz von Thiolen optimiert werden. Welche Mechanismen diesen Phänomenen zugrunde liegen, bedarf noch der Klärung.

5.2.2 Insulinfreisetzung durch Aminosäuren

Da N-Acetyl-L-Cystein unter anderem zu Cystein metabolisiert (deacetyliert) wird, muß im Zusammenhang mit möglichen Wirkungen dieser Substanz auch die Insulinfreisetzung durch Aminosäuren diskutiert werden, die bereits wesentlich früher und besser dokumentiert ist als die durch Thiole (Floyd et al., 1966; Sussman et al., 1967; Malaisse und Malaisse-Lagae, 1968; Lambert et al., 1969; Basabe et al., 1971; Fajans et al., 1972). Freilich sind die erhobenen Befunde auch hier uneinheitlich.

Bei Verwendung der Aminosäure Leucin ermittelten Malaisse und Malaisse-Lagae (1968) am Ratten-Pankreasgewebe eine Verstärkung der Insulin-Freisetzung sowohl ohne als auch mit Zusatz von Glucose, was am perfundierten Pankreas von Basabe und Mitarbeitern (1971) und an der isolierten Insel von Lutz (1981) bestätigt wurde. Auch in Kombination mit Coffein kann

Leucin die Insulinsekretion aus Rattenpankreas steigern (Lambert et al., 1969). Eine Begünstigung der Leucin-induzierten Insulinfreisetzung aus der isolierten Insel vor allem bei Zusatz geringer Glucose-Mengen ermittelten Hoppe (1978) und Schäfer und Schatz (1981). Nach anderen Untersuchungen ist die durch Leucin induzierte Insulinsekretion durch Mannoheptulose und 2-Desoxy-D-Glucose hemmbar (Lucke et al., 1972). Bei der Beeinflussung des NADPH/NADP-Quotienten der Inselzellen ist die Erhöhung des NADPH-Gehalts durch Leucin glucoseabhängig, während eine Erhöhung des NADH auch ohne Glucosezusatz eintritt (Ammon et al., 1979 b; Malaisse et al., 1980). Für eine Beteiligung von NADPH an der leucin-induzierten Insulinsekretion sprechen in jedem Fall die Befunde, daß Methylenblau den durch Glucose + Leucin erhöhten NADPH/NADP-Quotienten senkt und gleichzeitig die gesteigerte Insulinfreisetzung hemmt, den Quotienten aus NADH und NAD aber nicht senkt (Ammon et al., 1979 b; Hoppe, 1978). Die Beeinflussung des GSH/GSSG-Quotienten schließlich ist ebenfalls glucoseabhängig: Mit 5,6 mM Glucose und 10 mM Leucin kann der Quotient erhöht werden, während beide Substanzen einzeln wirkungslos bleiben (Lutz, 1981).

Bei der Untersuchung der insulinotropen Effekte von Arginin haben Malaisse und Malaisse-Lagae (1968) gezeigt, daß der Zusatz von 1 mg/ml Glucose zu Arginin 10 mM zu einer Steigerung der Freisetzung aus Ratten-Pankreasgewebe führt. Dies wird bei fötalem Pankreasgewebe auch durch Arginin + Coffein erreicht (Lambert et al., 1969). Die Arbeiten von Basabe und Mitarbeitern (1971) sowie Levin und Mitarbeitern (1972) am perfundierten Pankreas erbrachten ähnliche Ergebnisse, hier wurde ebenfalls ein additiver Effekt von Arginin und Glucose festgestellt, wobei auch Arginin allein -dosisabhängig- die Insulinsekretion erhöhte. Im Gegensatz dazu ermittelten Schäfer und Schatz (1981), daß die Kombination von Arginin und Glucose an isolierten Langerhansschen Inseln der Ratte eine wesentlich geringere Insulinsekretion erbringt als

beispielsweise mit Leucin und Glucose. Nach anderen Untersuchungen führt Arginin nur bei Anwesenheit stimulatorischer Glucosekonzentrationen zu einer Steigerung der Insulinfreisetzung aus Inseln, nicht dagegen bei substimulatorischen Glucose-Konzentrationen (Hoppe, 1978). Hier zeigt sich ein Unterschied zu den Ergebnissen mit Leucin. Des weiteren ist nach den Angaben von Lucke und Mitarbeitern (1972) die Leucin-induzierte Insulinfreisetzung mit 2-Desoxy-D-Glucose hemmbar. Dies ist bei der Arginin-induzierten nicht möglich. Auch bei den NADPH/NADP- und NADH/NAD-Quotienten Langerhansscher Inseln, von denen zumindest der erste für die Insulinfreisetzung von Bedeutung sein dürfte, waren keine Veränderungen durch Arginin festzustellen. Ebenso wie bei Leucin läßt sich aber die Arginin/Glucose-induzierte Insulinsekretion durch Methylenblau hemmen (Hoppe, 1978).

Nach den vorliegenden Untersuchungen sind Leucin und Arginin, möglicherweise auch noch andere Aminosäuren, in der Lage, die Insulinfreisetzung aus Langerhansschen Inselzellen zu erhöhen. Dabei ist aber bisher unbeantwortet geblieben, ob dieser Effekt glucoseabhängig ist oder nicht, und wenn ja, welche Glucose-Konzentrationen den Effekt der Aminosäuren optimieren können. Desgleichen ist noch offen, ob der Metabolismus der Aminosäuren in diesem Zusammenhang eine Rolle spielt, was bisher nur für Arginin ausgeschlossen wird (Hellman et al., 1971), und ob der sekretionssteigernde Effekt der Aminosäuren bei der glucoseinduzierten Insulinsekretion dosisabhängig und additiv oder potenzierend ist.

5.2.3 Insulinfreisetzung durch N - Acetyl - L - Cystein

Die insulinotrope Wirkung von N-Acetyl-L-Cystein ist bisher noch nicht untersucht worden, daher gestattet die Diskussion in diesem Kapitel keinen Vergleich mit bzw. Rückgriff auf vorhandene Arbeiten.

Bei der zunächst vorgenommenen Verabreichung von N-Acetyl-L-Cystein und Glucose in zehnminütigem Abstand zeigt sich vor der Glucose-Gabe keinerlei Änderung des Plasma-Insulins. Die anschließende glucoseinduzierte Insulinsekretion allerdings fällt stark (signifikant) erhöht aus. Das läßt darauf schließen, daß N-Acetyl-L-Cystein zu den Substanzen gehört, die für sich allein keine erhöhte Insulinfreisetzung auslösen, aber die glucoseinduzierte Insulinfreisetzung verstärken können. Dies wird auch dadurch gestützt, daß die rein glucosevermittelte Insulinsekretion einen initialen Peak mit im Folgenden abfallenden Werten zeigt, während die Kombination zu längere Zeit stark erhöhten Plasma-Insulinwerten führt, die auch nach einer halben Stunde noch bestehen.

Wendet man sich den Untersuchungen zu, bei denen verschiedene Dosen der Substanz unmittelbar vor der Glucose-Gabe injiziert wurden, so kann man erkennen, daß die Höhe des initialen Peaks und der weitere Verlauf der Plasma-Insulinspiegel offensichtlich dosisabhängig ist. Dabei fällt auf, daß die Plasmaspiegel nach den beiden höheren Dosierungen eine sehr ähnliche Entwicklung zeigen und dauerhaft (Meßzeitraum: 30 bzw. 40 Minuten) auf einem hohen Niveau bleiben, ohne daß ein zweiter Peak zeitlich genau zugeordnet werden könnte. Bei der kleinsten Dosierung N-Acetyl-L-Cystein dagegen ist die initiale Insulinausschüttung ebenfalls erhöht, doch paßt sich der weitere Verlauf der Plasma-Insulinspiegel eher der Kontrollgruppen-Kurve an und ist nach einer halben Stunde sogar unter diese abgesunken. Hier sprechen die Untersuchungsergebnisse deutlich für eine monophasische Stimulation der Insulinsekretion.
Die Erhöhung des Plasma-Insulins vor der Verabreichung von N-Acetyl-L-Cystein und Glucose bei der ersten Gruppe dieses Versuchsblocks trat bei allen übrigen Versuchsreihen nicht auf. Eine sinnvolle Erklärung für dieses Phänomen ergibt sich aus den vorliegenden Untersuchungen nicht.

Im Zusammenhang mit der Frage, ob die Verstärkung der glucoseinduzierten Insulinsekretion durch N-Acetyl-L-Cystein vom Zeitpunkt der Verabreichung der Substanz abhängig ist, wurde deren Injektion u.a. auch eine halbe Stunde vor der Glucose-Gabe vorgenommen. Bei diesen Versuchsbedingungen konnte nach den anfangs durchgeführten pharmakokinetischen Untersuchungen davon ausgegangen werden, daß die Plasmaspiegel der Gesamt-Thiole und der löslichen Thiole zum Zeitpunkt der Glucose-Belastung bereits wieder auf ihr Ausgangsniveau abgesunken waren. Damit sollte geklärt werden, ob die durch N-Acetyl-L-Cystein ausgelöste Erhöhung der glucoseinduzierten Insulinfreisetzung nur dann eintritt, wenn bei Verabreichung der Glucose (noch) ein erhöhter Plasma-Thiolspiegel vorliegt, oder ob dieser Effekt unabhängig von einem erhöhten Spiegel der Thiole im Plasma eintritt. Die entsprechenden Versuche haben gezeigt, daß auch bei Injektion der Substanz eine halbe Stunde vor der Glucose eine deutliche Verstärkung der glucoseinduzierten Insulinfreisetzung zu verzeichnen ist. Somit scheint diese Wirkung des N-Acetyl-L-Cystein nicht von erhöhten Plasma-Thiolspiegeln abhängig zu sein. Die Befunde legen vielmehr die Vermutung nahe, daß die Substanz ihre Wirkung in anderen Kompartimenten ausübt bzw. dort Stoffwechselprozesse auslöst, die ihrerseits zu einer Erhöhung der glucoseinduzierten Insulinsekretion führen. Dabei kann auch an die Bereitstellung von Reduktionsäquivalenten durch diese Verbindung gedacht werden. Diese Reduktionsäquivalente könnten über eine entsprechende Beeinflussung des NADPH/NADP-Systems und des vermutlich damit in Verbindung stehenden GSH/GSSG-Systems eine Voraussetzung für die Verstärkung der durch Glucose induzierten Freisetzung von Insulin schaffen, so wie es im Zusammenhang mit anderen Untersuchungen bereits postuliert worden ist (Ammon et al., 1977 & 1979 a/b; Ammon und Verspohl, 1976 & 1979; Malaisse et al., 1979 a/b; Ammon et al., 1980).

Die Befunde, die im Rahmen dieser Arbeit zu den Zusammenhängen zwischen dem Verabreichungszeitpunkt von N-Acetyl-L-Cystein und seiner Wirkung auf die glucoseinduzierte Insulinsekretion erhoben wurden, belegen in jedem Fall, daß der im Zusammenwirken mit Glucose zu beobachtende insulinotrope Effekt der Verbindung

a) sehr schnell eintritt (er ist bei verschiedenen Dosen bereits unmittelbar nach Verabreichung nachweisbar).
b) kein kurzfristiger Effekt ist, sondern (dosisabhängig) längere Zeit nach Glucose-Gabe anhält (nach den vorliegenden Untersuchungen ab 0,05 mmol/kg mindestens 40 Minuten).
c) offensichtlich nicht an eine Erhöhung der Plasma-Thiole gebunden ist (da er auch dann noch eintritt, wenn sich die Plasma-Thiole bereits wieder "normalisiert" haben). Die Wirkung von N-Acetyl-L-Cystein geht offensichtlich eher dahin, in anderen Kompartimenten die -auch länger anhaltenden- stoffwechselmäßigen bzw. rezeptortechnischen Voraussetzungen für eine Verstärkung der Glucosewirkung zu schaffen.

Betrachtet man außerdem das Ausmaß der Insulinausschüttung, wenn dieselbe Dosis (0,1 mmol/kg) N-Acetyl-L-Cystein zu verschiedenen Zeiten vor der Glucose verabreicht wurde, so bewegt sich diese Insulinausschüttung bzw. deren Steigerung gegenüber dem Ausgangsniveau immer in derselben Größenordnung. Das läßt darauf schließen, daß das Ausmaß der Verstärkung der glucoseinduzierten Insulinsekretion durch N-Acetyl-L-Cystein zwar dosisabhängig, aber unabhängig vom Verabreichungszeitpunkt ist. Dafür sprechen auch die oben unter c) genannten Erkenntnisse.

Die Wirkung von N-Acetyl-L-Cystein allein auf die Plasma-Insulinspiegel ist in den verschiedenen Versuchsreihen unterschiedlich. Hier reichen die Befunde von einer deutlichen Erniedrigung bis zu einer deutlichen Erhöhung. Insofern läßt

sich aus den durchgeführten Untersuchungen keine schlüssige Aussage zu diesem Punkt ableiten.

Eine Schädigung des Insulins durch N-Acetyl-L-Cystein scheidet als Ursache erniedrigter Plasma-Insulinspiegel aus, da eine solche Schädigung bei Dosen bis zu 0,1 mmol/kg weder bei den vorliegenden in vivo - Versuchen noch bei in vitro - Versuchen in unserem Arbeitskreis (Enz und Hehl, pers. Mitteilung) festgestellt werden konnte. Die Insulin-Eichkurven werden durch die Substanz kaum beeinflußt.

5.3 N - Acetyl - L - Cystein und Plasma - Glucose

Die Zusammenhänge zwischen der intravenösen Verabreichung von N-Acetyl-L-Cystein und einer möglichen Veränderung der Glucose-Elimination aus dem Plasma nach Glucose-Belastung wurden bisher nicht untersucht, so daß keine Vergleichsmöglichkeiten mit anderen Arbeiten gegeben sind. Für die entsprechenden Versuche waren Glucose-Belastungen von 250 mg und 500 mg/kg gewählt worden.

5.3.1 Effekte auf die Glucose-Elimination nach 250 mg Glucose/kg

Die beiden Dosierungen von N-Acetyl-L-Cystein (0,3 bzw. 1,0 mmol/kg) wurden zehn Minuten vor der Glucose verabreicht, um zu gewährleisten, daß sich die Substanz vor der Glucose-Gabe auch in periphere Kompartimente bzw. Gewebe verteilen kann. In diesem Zeitraum ergab sich bereits eine leichte Erhöhung der Plasma-Glucose, die aber bei allen drei Versuchsreihen gleichermaßen auftrat und von daher keine Aussage über eine entsprechende Wirkung speziell von N-Acetyl-L-Cystein gestattet. In dem Beobachtungszeitraum nach der Glucose-Injektion konnten ebenfalls keinerlei Anhaltspunkte für Unterschiede in der plasmatischen Glucose-Elimination zwischen der Kontrollgruppe und den Versuchsgruppen gefunden werden. Unter den beschriebenen Versuchsbedingungen wird die Glucose-Elimination durch N-Acetyl-L-Cystein in keiner Weise modifiziert.

5.3.2 Effekte auf die Glucose - Elimination nach 500 mg Glucose/kg

In diesem Versuchsblock wurde zunächst die Kombination 0,1 mmol/kg N-Acetyl-L-Cystein 10 Minuten vor Glucose-Gabe

getestet, um -wie bereits unter 5.3.1 dargestellt- eine Gewebeverteilung der Substanz vor der Glucose-Injektion zu gewährleisten. Bei dieser Untersuchung zeigte sich praktisch kein Unterschied zwischen der Versuchs- und der Kontroll-Gruppe, mit Ausnahme der Tatsache, daß die Tiere der Versuchsgruppe ab der 20. Minute teilweise weiter fallende, teilweise aber auch wieder steigende ("rebound-Phänomen") Plasma-Glucosespiegel zeigten. Das weist darauf hin, daß bei den Tieren möglicherweise interindividuelle Schwankungen bei dem Einfluß von N-Acetyl-L-Cystein auf die Spätphase der Glucose-Elimination nach Belastung bestehen. Unabhängig von ihrer Ursache aber führen diese Schwankungen dazu, daß die letzten durchschnittlichen Meßwerte der Versuchsgruppe kaum noch fallende Glucosespiegel zeigen.

Etwas differenzierter wird das Bild, wenn fallende Konzentrationen (0,1 , 0,05 und 0,025 mmol/kg) N-Acetyl-L-Cystein unmittelbar vor der Glucose verabreicht werden. In der Auswertung dieser Reihe (siehe Kapitel 4.3.2) ergibt sich nämlich für die kleinste Konzentration von N-Acetyl-L-Cystein ein signifikant geringerer initialer Anstieg der Plasma-Glucose nach Belastung. Dies könnte evtl. damit zusammenhängen, daß bei dieser niedrigen Dosierung (im Gegensatz zu den höheren Dosierungen) die Glucose-Utilisation in der Frühphase nach Belastung verbessert ist. Dies bleibt allerdings auch die einzige verwertbare Erkenntnis aus der Gegenüberstelllung dieser Versuchsreihen, bei denen sich die Kurvenverläufe ansonsten sehr stark angleichen. Auch das Phänomen steigender Glucose-Plasmaspiegel in der Spätphase tritt wieder auf.

Um der Substanz längere Zeit für eine mögliche Penetration in Zellen bzw. Gewebe zu geben und zum Zeitpunkt der Glucose-Gabe keine stärker erhöhten Plasma-Thiolspiegel mehr zu haben, wurde schließlich noch die Kombination 0,1 mmol/kg N-Acetyl-L-Cystein eine halbe Stunde vor Glucose-Gabe

geprüft, doch resultierten daraus keine weitergehenden Erkenntnisse. Weder in dem Beobachtungszeitraum vor noch nach der Glucose-Injektion konnte ein gegenüber der Kontrollgruppe veränderter Kurvenverlauf festgestellt werden.

Trotz der Vielfalt der bei den Versuchsbedingungen gewählten Kombinationen konnte mithin ein Einfluß von N-Acetyl-L-Cystein auf die Glucose-Elimination aus dem Plasma nicht gefunden werden. Es wäre denkbar, daß die Zufuhr der verwendeten Thiol-Dosen als Bolus-Injektion Stoffwechselprobleme für die Versuchstiere mit sich brachte. Weitere Untersuchungen werden klären müssen, ob die Glucose-Elimination möglicherweise durch die kontinuierliche Zufuhr kleiner Mengen N-Acetyl-L-Cystein beeinflußt werden kann.

6. Z U S A M M E N F A S S U N G

6.1 Fragestellung

1.) An narkotisierten Ratten wurde untersucht, welche Veränderungen der Plasma-Thiole nach der intravenösen Gabe von N-Acetyl-L-Cystein eintreten.

2.) Bei in vivo - Versuchen an Ratten wurde geprüft, ob die intravenöse Verabreichung von N-Acetyl-L-Cystein die Plasma-Insulinspiegel und die glucoseinduzierte Insulinsekretion beeinflußt und ob Effekte der Substanz auf die Plasma-Glucose vor und nach Glucose-Belastung festgestellt werden können.

6.2 Ergebnisse

1.) Die intravenöse Verabreichung von N-Acetyl-L-Cystein ergibt eine Erhöhung der Gesamt-Thiole und der löslichen Thiole im Plasma von Ratten. Eine Erhöhung der proteingebundenen Thiole ist nur bei höherer Dosis (0,3 mmol/kg) feststellbar. Die Glucose-Gabe ergibt keine erkennbare Änderung der Plasma-Thiolkurven.

2.) Die Beeinflussung des Plasma-Insulins durch die Substanz allein (i.v.) ist uneinheitlich. Wird N-Acetyl-L-Cystein dagegen in Kombination mit Glucose verabreicht, so führt dies bei allen verwendeten Dosierungen zu einer starken Erhöhung der durch Glucose induzierten Insulinsekretion. Effekte der Substanz auf die Plasma-Glucose sind -auch nach Glucose-Belastung- nicht festzustellen.

6.3 Schlußfolgerungen

1.) Mit Hilfe von N-Acetyl-L-Cystein (i.v.) können die Plasma-Thiole dosisabhängig auch über einen längeren Zeitraum (30 Minuten) erhöht werden.

2.) Mit der i.v.-Verabreichung des Thiols allein ist in vivo keine erhöhte Insulinsekretion zu erzielen.

3.) Dagegen wird die glucoseinduzierte Insulinsekretion durch N-Acetyl-L-Cystein stark erhöht.

4.) Trotz der starken Erhöhung der glucoseinduzierten Insulinsekretion wird die Elimination der Glucose nach i.v.-Belastung durch dieses Thiol nicht beschleunigt. Die vorliegenden Befunde sprechen dafür, daß das Insulin unter diesen Bedingungen offensichtlich keine volle Wirkung entfalten kann.

7. L I T E R A T U R V E R Z E I C H N I S

Abdel Hamid, M.A. (1983):
Zur Rolle von Thiolen bei der Freisetzung von Insulin und der Bildung von cAMP in der Langerhansschen Insel der Ratte.
Dissertation Tübingen

Ammon, H.P.T. (1973 a):
Effect of glucose and methylene blue (MB) on NADP, NADPH and insulin secretion of isolated pancreatic rat islets.
Arch. Pharmacol. 272, Suppl. R 1 (Abstract)

Ammon, H.P.T. (1973 b):
Stimulierung der Insulinsekretion durch Tolbutamid. Untersuchungen beim experimentellen Diabetes.
Arzneimittel-Forschung (Drug Res.) 23, 1675-1676

Ammon, H.P.T., Verspohl, E. (1976):
Pyridine nucleotides in pancreatic islets during inhibition of insulin release by exogenous insulin.
Endocrinology 99, 1469-1476

Ammon, H.P.T., Akhtar, M., Niklas, H., Hegner, D. (1977):
Inhibition of p-chlormercuribenzoate- and glucose-induced insulin release in vitro by methylene blue, diamide, and tert.-butyl hydroperoxide.
Mol. Pharmacol. 13, 598-605

Ammon, H.P.T., Grimm A., Wagner-Teschner, D., Verspohl E.S., Händel, M. (1978):
GSH/GSSG and NADPH/NADP ratios of pancreatic islets depend on glucose concentration.
Diabetes 27, Suppl. 2, 466

Ammon, H.P.T., Verspohl E. (1979):
Effect of methylene blue on pyridine nucleotides and insulin secretion of rat pancreatic islets.
Diabetologia 17, 41-44

Ammon, H.P.T., Akhtar, M., Grimm A., Niklas H. (1979 a):
Effect of methylene blue and thiol oxidants on pancreatic islet GSH-GSSG ratios and tolbutamide mediated insulin release in vitro.
Naunyn-Schmiedebergs Arch. Pharmacol. 307, 91-96

Ammon, H.P.T., Hoppe, E., Akhtar, M.S., Niklas, H. (1979 b):
Effect of leucine on the pyridine nucleotide contents of islets and on the insulin release - interactions in vitro with methylene blue, thiol oxidants and p-chloromercuribenzoate.
Diabetes 28, 593-599

Ammon, H.P.T., Grimm, A., Lutz, S., Wagner-Teschner, D., Händel, M., Hagenloh, I. (1980):
Islet glutathione and insulin release.
Diabetes 29, 830-834

Ammon, H.P.T., Heinzl, S., Abdel Hamid, M., Kallenberger, H.-M., Hagenloh, I. (1982):
Effect of diamide and reduced glutathione on the elevated levels of cyclic AMP in rat pancreatic islets exposed to glucose, p-chloromercuribenzoate and aminophylline.
Naunyn-Schmiedebergs Arch. Pharmacol. 319, 243-248

Anjaneyulu, K., Anjaneyulu, R., Sener, A., Malaisse, W.J. (1982):
The stimulus-secretion coupling of glucose - induced insulin release. Thiol: disulfide balance in pancreatic islets.
Biochimie 61, 29-36

Ashcroft, S.J.H. (1980):
Review Articles. Glucoreceptor mechanismus and the control of insulin release and biosynthesis.
Diabetologia 18, 5-15

Bartek, M.I., et al. (1972):
Skin permeability in vivo: comparison in rat, rabbit, pig and man.
J. Invest. Dermatol. 58, 114

Basabe, I.C., Lopez, N.L., Viktora, J.K., Wolff, F.W. (1971):
Insulin secretion studied in the perfused rat pancreas, I: Effect of tolbutamide, leucine and arginine; Their interactions with diazoxide, and relation to glucose.
Diabetes 20, 449-456

Beatty, P., Reed, D.J. (1981):
Influence of cysteine upon the glutathione status of isolated rat hepatocytes.
Biochemical Pharmacology 30, 1227-1230

Benesch, R.E., Lardy, H.A., Benesch, R. (1955):
The sulfhydryl groups of crystalline proteins, I: Some albumins, enzymes, and hemoglobins.
J. Biol. Chem. 216, 663-676

Bernstein, I.L., Ausdenmoore, R.W. (1964):
Iatrogenic bronchospasm occurring during clinical trials of a new mucolytic agent, acetylcysteine.
Dis. Chest 46, 469

Berrigan, M.J., Gurtoo, H.L., Sharma, S.D., Struck, R.F., Marinello, A.J. (1980):
Protection by N-acetylcysteine of cyclophosphamide metabolism - related in vivo depression of mixed function oxygenase activity and and in vitro denaturation of cytochrome P-450.
Biochemical and Biophysical Research Communications 93, 797-803

Bloom, G.D., Hellman, B., Idahl, L.A., Lernmark, A., Sehlin, I., Täljedal, I.B. (1972):
Effects of organic mercurials on mammalian pancreatic ß-cells; Insulin release, glucose transport, glucose oxidation, membrane permeability and ultrastructure.
Biochem. J. 129, 241-254

Boman, G., Larsson, S., Holander, B., Wählander, L.A. (1983):
Long-Term treatment with oral acetylcysteine in chronic bronchitis.
Eur. J. Respir. Dis. 64, 405-415

Bonamomi, L., Gazzaniga, A. (1980):
Toxicological, pharmacokinetic and metabolic studies on acetylcysteine.
Eur. J. Respir. Dis. 61, Suppl. 111, 45-51

Botta, J.A., Nelson, L. W., Weikel Jr., J.H. (1973):
Acetylcysteine in the prevention of cyclophosphamide - induced cystitis in rats.
J. Natl. Cancer. Inst. 51, 1051-1058

Boyer, P.D. (1954):
Spectrophotometric study of the reaction of protein sulfhydryl groups with organic mercurials.
J. Amer. Chem. Soc. 76, 4331-4337

Brisson, G.R., Malaisse-Lagae, F., Malaisse, W.J. (1972):
The stimulus secretion coupling of glucose - induced insulin release. VII. A proposed site of action for adenosine - 3',5' - cyclic monophosphate.
J. Clin. Invest. 51, 232-241

Brocard, H., Charpin, J., Germonty, J. (1980):
Acute indications for acetylcysteine.
Eur. J. Respir. Dis. 61, Suppl. 111, 65-69

Carnevale, J., Healey, K., Cole, E.R. (1982):
Determination of thiols by titrimetric and chromatographic procedures based on reactions with aromatic thiosulfonates.
Analytica Chimica Acta 140, 143-151

Chodosh, S. (1971):
Efficacy of aerosolized acetylcysteine, acetylcysteine with isoproterenol, and isoproterenol in stable chronic bronchitis at home: A double-blind, crossover evaluation.
Am. Rev. Resp. Dis. 103, 904

Chodosh, S., et al. (1975):
Long-term home use of acetylcysteine in chronic bronchitis.
Curr. Ther. Res. 17, 319-334

Dano, G. (1971):
Bronchospasm caused by acetylcysteine in children with bronchial asthma.
Acta Allergol 26, 181

Davis, J. B., Lindstrom, F. (1972):
Spectrophotometric microdetermination of sulfate.
Anal. Chem. 44, 524-532

Denton, R., et al (1967):
N-acetylcysteine in cystic fibrosis.
Am. Rev. Resp. Dis. 95, 643

Derman, J., Breslow, L., Ingal, D. (1975):
Nonoperative treatment of meconium ilens equivalent.
Am. J. Dis. Child 129, 1210-1211

Douglas, W.W., Ishida, A., Poisner, A.M. (1965):
The effect of metabolic inhibitors on the release of vasopressin from isolated neurohypophysis.
J. Physiol. Lond. 181, 753-759

Dreisin, R. B., Mostow, S. R. (1979):
Sulfhydryl-mediated depression of ciliary activity: an adverse effect of acetylcysteine.
J. Lab. Clin. Med. 93, 674-678

Dresdale, A. R., Barr, L. H., Bonow, R. O. (1982):
Prospective randomized study of the role of N-acetylcysteine in reversing doxorubicin-induced cardiomyopathy.
Am. J. Clin. Oncol. 5, 657-663

Ellman, G. L. (1959):
Tissue sulfhydryl groups
Arch. of. Biochemistry and Biophysics 82, 70-77

Erlichman, I., Schubart, V., Fleischer, N. (1979):
Sulfhydryl reagent-induced insulin release and $^{45}Ca^{2+}$ fluxes in Syrian hamster insulinoma cells.
Endocrinology 105, 1183-1190

Eujen, R. (1979):
Zur Rolle des reduzierten Glutathions Langerhansscher Inseln der Ratte bei der Sekretion von Insulin.
Dissertation Tübingen

Fahey, R. C., Newton, G. L., Dorian, R., Kosower, E.M. (1980):
Analysis of biological thiols: Derivitization with monobromotrimethylammoniobimane and characterization by electrophoresis and chromatography.
Analytical Biochemistry 107, 1-10

Fahey, R. C., Newton, G. L., Dorian, R., Kosower E. M., (1981):
Analysis of biological thiols: quantitative determination of thiols at the picomole level based upon derivatization with monobromobimanes and separation by cation-exchange chromatography.
Analytical Biochemistry 111, 357-365

Fajans, S. S., Floyd, I. C., Knopf, R. F., Gruntsche, E. M., Rull, I. A., Thiffault, C. A., Conn, J. W. (1967):
A difference in mechanism by which leucine and other amino acids induce insulin release.
J. Clin. Endocr. 27, 1600

Fajans, S. S., Floyd, J. C., Knopf, R. F., Pek, S., Weissman P., Conn J. W. (1972):
Amino acids and insulin release in vivo.
Israel J. Med. Sci. 8, 233-243

Fawell, J. K. (1976):
Autoradiography of ^{35}S-N-Acetyl-L-Cysteine.
Inveresk Research International (Großbritannien), Bericht Nr. 543 (unveröffentlicht)

Floyd Jr., J. C., Fajans, S. S., Conn, J. W., Knopf, R. F., Rull, J. (1966):
Stimulation of insulin secretion by amino acids.
J. Clin. Invest. 45, 1487

Freeman, R. W., Mac Donald, J. S., Olson, R. D., Boerth, R. C., Oates, J. A., Harbison, R. D. (1980):
Effect of sulfhydryl-containing compounds on the antitumor effects of adriamycin.
Toxicology and Applied Pharmacology 54, 168-175

Gracey, M., et al. (1969):
Treatment of abdominal pain in cystic fibrosis by oral administration of N-acetylcysteine.
Arch. Dis. Child 44, 404

Grasetti, D. R. (1969):
Some biochemical effects of thione-forming disulfids and their use in the study of cell thiols.
Ann. Ist. Sup. Sanita 5, 645

Grasetti, D. R., Murray Jr., J. F.(1970):
Modification of external sulfhydryl groups of Ehrlich ascites tumor cells with 6,6'-dithiodinicotinic acid.
Biochem. Pharmacol. 19, 1836

Grassi, C. (1980):
Long-term oral acetylcysteine in chronic bronchitis. A double-blind controlled study.
Eur. J. Respir. Dis. 61, Suppl. 111, 93-108

Grassi, C., Morandini, G. C. (1976):
A controlled trial of intermittent oral acetylycysteine in the long-term treatment of chronic bronchitis.
Eur. J. Clin. Pharmacol. 9, 393

Grimm, A. (1978):
Glutathion und Insulinsekretion. Mikromethoden zur Bestimmung von reduziertem und oxidiertem Glutathion in Langerhansschen Inseln. Beziehungen zwischen dem GSH/GSSG-Quotienten und glucoseinduzierter Insulinsekretion.
Dissertation Tübingen

Häberle, D., Wahlländer, A., Sies, H. (1979):
Assessment of the kidney function in maintenance of plasma glutathion concentration and redox state in anaesthetized rats.
FEBS Letters 108, 335-340

Hägele, R. (1981):
Einfluß extrazellulär und intrazellulär wirkender Thioloxidantien auf die 45-Calciumaufnahme Langerhansscher Inseln der Ratte.
Dissertation Tübingen

Händel, M. (1978):
Pentosephosphatshunt Langerhansscher Inseln und Insulinsekretion.
Dissertation Tübingen

Hebel, R. (1976):
Anatomy of the laboratory rat.
The Williams & Wilkins Company, Baltimore

Hellman, B., Sehlin, J., Täljedal, I.-B. (1971):
Effects of glucose and other modifiers of insulin release on the oxidative metabolism of amino acids in microdissected islets.
Biochem. J. 123, 513-521

Hellman, B. Sehlin, J. Täljedal, I.-B. (1972):
Transport of L-Leucine and D-Leucine into Pancreatic ß-cells with reference to the mechanisms of amino acid-induced insulin release.
Biochim. Biophys. Acta 266, 436-443

Hellman, B., Idahl, L.-A., Lernmark, A., Sehlin, J., Täljedal, I.-B. (1973 a):
Jodacetamide-induced sensitization of pancreatic ß-cells to glucose stimulation.
Biochem. J. 132, 775-789

Hellman, B., Idahl, L. A., Lernmark, A., Sehlin, J.Täljedal, I.-B. (1973 b):
Role of thiol groups in insulin release: studies with poorly permeating disulphides.
Mol. Pharmacology 9, 792-801

Hellman, B., Idahl, L. A., Lernmark, A., Sehlin, J., Täljedal, I.-B. (1974):
Membrane sulphydryl groups and the pancreatic ß-cell recognition of insulin secretagogues.
in: Diabetes, Malaisse, W. J., Priart, J. eds., Proc. of the 8th Congress IDF, Excerpta Medica, Amsterdam, 65-78

Hellman, B., Idahl, L.A., Lernmark, A., Sehlin J., Täljedal I.-B. (1975):
Stimulation of insulin release by thiols.
Biochim. Biophys. Acta 392, 101-109

Hellman, B., Lernmark, A., Sehlin, J., Söderberg, M., Täljedal, I.-B. (1976):
On the possible role of thiol groups in the insulin-releasing action of mercurials, organic disulfides, alkylating agents, and sulfonylureas.
Endocrinology 99, 1398-1406

Hellman, B., Gylfe, E., Berggren, P.O., Andersson, T., Abrahamsson, H., Rorsman, P., Betsholtz, C. (1981):
Ca^{2+} transport in pancreatic beta-cells during glucose stimulation of insulin secretion.
Ups. J. Med. Sci. 85 (3), 321-329

Henquin, J. C. (1980):
Metabolic control of the potassium permeability in pancreatic islet cells.
Biochem. J. 186, 541-550

Hirsch, S. R., Kory, R. C. (1967):
An evaluation of the effect of nebulized N-acetylcysteine on sputum consistency.
J. Allergy 39, 265

Hirsch, S. R., et al. (1965):
Effect of saline, alevaire, and mucomyst on sputum volume and consistency.
J. Allergy 36, 211

Hirsch, S. R., et al (1970):
Clinical and physiological evaluation of mucolytic agents nebulized with isoproterenol: 10 % N-acetylcysteine versus 10 % 2-Mercaptoethane sulfonate.
Thorax 25, 737

Hodson, M. D., Mearns, M. B., Batten, J. C. (1976):
Meconium ileus equivalent in adults with cystic fibrosis of pancreas: a report of six cases.
Br. Med. J. 2, 790-791

Hoppe, E. (1978):
Einfluß von Leucin und Arginin auf die Sekretion von Insulin sowie den NADPH/NADP-Quotienten und den NADH/NAD-Quotienten Langerhansscher Inseln.
Dissertation Tübingen

Howell, S. L., Tyhurst, M. (1982):
Microtubules, microfilaments and insulin secretion.
Diabetologia 22, 301-308

Hurst, G. A., et al. (1967):
Laboratory and clinical evaluation of the mucolytic properties of acetylcysteine.
Am. Rev. Resp. Dis. 96, 962

Isles, T. E., Jocelyn, P. C. (1963):
The reaction of protein thiol groups with some disulphides.
Biochem. J. 88, 84-88

Keaney, N. P., Cocking, G. (1981):
N-acetylcysteine protection against halothane hepatotoxicity: experiments in rats.
Lancet 2, 95

Kory, R. C., et al. (1968):
Nebulization of N-acetylcysteine combined with a bronchodilator in patients with bronchitis.
Dis. Chest 54, 504

Lambert, A. E., Jeanrenaud, B., Junod, A., Renold, A.E. (1969):
Organ culture of fetal rat pancreas, II. Insulin release induced by amino and organic acids, by hormonal peptides, by cationic alterations of the medium and by other agents.
Biochim. Biophys. Acta 174, 540-553

Landgraf-Leurs, M.M.C., Mayer, L., Landgraf, R. (1978):
Sulphydryl requirement for insulin release from the perfused pancreas; Studies with ethacrynic acid and dithiothreitol.
Diabetologia 15, 337-342

Lemp, M. A., Roddy, M. (1974):
Effect of acetylcysteine (Mucomyst^{R}) on reepitheliialization of the cornea.
Ann. Ophthal. 6, 893-895

Levin, S. R., Grodsky, G. M., Hagura, R., Smith, D. F., Forsham, P. H. (1972):
Relationships between arginine and glucose in the induction of insulin secretion from the isolated, perfused rat pancreas.
Endocrinology 90, 624-631

Lorber, A., Pearson, C. M., Meredith, W. L., Gantz-Mandell, L. E. (1964):
Serum sulfhydryl determinations and significance in connective tissue diseases.
Ann. Intern. Med. 61, 423-434

Lorber, A., Chang, C. C., Masuoka, D., Meacham, J. (1970):
Effect of thiols in biological systems on protein sulfhydryl content.
Biochemical Pharmacology 19, 1551-1560

Lucke, C., Kagan, A., Adelman, N., Glick, S. M. (1972):
Effect of 2-Deoxy-D-Glucose and mannoheptulose on the insulin response to amino acids in rabbits.
Diabetes 21, 1-5

Lutz, S. (1981):
Untersuchungen zum Redoxstatus des Glutathionsystems in der Langerhansschen Insel der Ratte. Einfluß von Perinatalzeit, exogenem Insulin und Leucin.
Dissertation Tübingen.

Maddock, J. (1980):
Biological properties of acetylcysteine: Assay development and pharmacokinetic studies.
Eur. J. Respir. Dis. 61, Suppl. 111, 52-58

Malaisse, W. J., Malaisse-Lagae, F. (1968):
Stimulation of insulin secretion by noncarbohydrate metabolites.
J. Lab. Clin. Med. 72, 438-448

Malaisse, W. J., Sener, A., Boschero, A. C., Kawazu, S., Devis, G., Somers, G. (1978):
The stimulus-secretion coupling of glucose-induced insulin release. Cationic and secretory effects of menadione in the endocrine pancreas.
Eur. J. Biochem. 87, 111-120

Malaisse, W. J., Hutton, J. C., Kawazu, S., Herchuelz, A., Valverde, J., Sener, A. (1979 a):
The stimulus-secretion coupling of glucose-induced insulin release. XXXV. The links between metabolic and cationic events.
Diabetologia 16, 331-341

Malaisse, W. J., Sener, A., Herchuelz, A., Hutton, J. C. (1979 b):
Insulin release: the fuel hypothesis
Metabolism 28, 373-386

Malaisse, W. J., Hutton, J. C., Carpinelli, A. R., Herchuelz, A., Sener, A. (1980):
The stimulus-secretion coupling of aminoacids-induced insulin release. Metabolism and cationic effects of leucine.
Diabetes 29, 431-437

Matschinsky, F. M., Ellerman, J. E. (1968):
Metabolism of glucose in the islets of Langerhans.
J. Biol. Chem. 243, 2730-2736

Melien, M.C.M. (1984):
Einfluß von reduziertem Glutathion und Propylthiouracil auf die Insulinsekretion der Ratte. In-Vivo-Untersuchungen zur Pharmakokinetik des GSH und zur Wirkung des GSH und des Propylthiouracils auf die Glucosetoleranz und die Freisetzung des Insulins.
Dissertation Tübingen

Milner, R. D. G. (1969):
The mechanism by which leucine and arginine stimulate insulin release in vitro.
Biochim. Biophys. Acta 192, 154-156

Mitchell, E. A., Elliott, R. B. (1981):
Failure of oral N-acetylcysteine to improve the malabsorption of cystic fibrosis.
Aust. Paediatr. J. 17, 207-208

Mitchell, E. A., Elliott, R. B. (1982):
Controlled trial of oral N-acetylcysteine in cystic fibrosis.
Aust. Paediatr. J. 18, 40-42

Morgan, L. R., Douley, P.J., Harrison, E. F. (1981):
The control of ifosfamide induced hematuria with N-acetylcysteine.
Abstracts (AACR), 190 (Nr. 754)

Newton, G. L., Dorian, R., Fahey, R. C. (1981):
Analysis of biological thiols: derivatization with monobromobimane and separation by reverse phase high-performance liquid chromatography.
Analytical Biochemistry 114, 383-387

Niklas, H. (1978):
Einfluß von Methylenblau, Diamid und t-Butylhydroperoxid auf die Sekretion von Insulin aus der isolierten Langerhansschen Insel des Rattenpankreas.
Dissertation Tübingen

Paez, P. N., et al (1966):
The effects of direct instillations of a therapeutic mixture into the tracheobronchial tree.
Can. Med. Assoc. J. 95, 522

Panten, U., Kriegstein, E. v., Poser, W., Schönborn, I., Hasselblatt, A. (1972):
Effects of l-leucine and -ketoisocaproate acid upon insulin secretion and metabolism of isolated pancreatic islets.
FEBS Lett. 20, 225-228

Panten, U., Christians, I. (1973):
Effects of aminonorbornane-2-carboxylic acid upon insulin secretion and fluorescence of reduced pyridine nucleotides of isolated perfused pancreatic islets.
Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmac. exp. Path. 276, 55-62

Panten, U., Christians, I., Kriegstein, E. v., Poser, W., Hasselblatt, A. (1973):
Effect of carbohydrates upon fluorescence of reduced pyridine nucleotides from perifused isolated pancreatic islets.
Diabetologia 9, 477-482

Panten, U., Christians, I., Kriegstein, E. v., Poser, W., Hasselblatt, A. (1974):
Studies on the mechanism of L-leucine and -ketoisocaproic acid-induced insulin release from perfused isolated pancreatic islets.
Diabetologia 10, 149-154

Peter, H., Bolt, H. M. (1981):
Irreversible protein binding of acrylonitrile.
Xenobiotica 11, 51-56

Peterson, R. G., Rumack, B. H. (1977):
Treatment of acute acetominophen poisoning with N-acetyl-cysteine.
JAMA 237, 2406

Peterson, R. G., Rumack, B. H. (1978):
Toxicity of acetaminophen overdose.
J. Am. Col. Emer. Physicians 7, 202

Prescott, L. F. (1981):
Treatment of severe acetaminophen poisoning with intravenous acetylcysteine.
Arch. Intern. Med. 141, 386-388

Pulle, D. F. et al. (1970):
A controlled study of the safety and efficacy of acetylcysteine-isoproterenol combination.
Curr. Ther. Res. 12, 485

Ramirez, J. (1966):
Bronchopulmonary lavage. New techniques and observations.
Dis. Chest. 50, 581

Rao, S. et. al. (1970):
Acute effects of nebulization of N-acetylcysteine on pulmonary mechanisms and gas exchange.
Am. Rev. Resp. Dis. 102, 17

Raggi, M. A., Cavrini, V., Di Pietra, A. M. (1982):
Colorimetric determination of acetylcysteine, penicillamine, and mercaptopropionylglycin in pharmaceutical dosage forms.
Journal of Pharmaceutical Sciences 71, 1384-1386

Reas, H. W. (1963).
The effects of N-acetylcysteine on the viscosity of tracheobronchial secretions in cystic fibrosis of the pancreas.
J. Pediatr. 62, 31

Reas, H. W.(1964):
The use of N-acetylcysteine in the treatment of cystic fibrosis.
J. Pediatr. 65, 543

Rink, H. (1974):
Thiol compounds in radiation biology.
In: Glutathione. Proc. of the 16th conference of the german society of biological chemistry (Eds.: L. Flohé, R. C. Benöhr, H. Siess, H. D. Waller, A. Wendel).
Georg Thieme Pub., Stuttgart, 206-216

Rodenstein, D., De Coster, A., Gazzaniga, A. (1978):
Pharmacokinetics of oral acetylcysteine: Absorption, binding and metabolism in patients with respiratory disorders.
Clinical Pharmacokinetics 3, 247-254

Sapp, C., Lord, M., Hammarlund, E. R. (1975):
Sodium chloride equivalents, cryoscopic properties, and hemolytic effects of certain medicinals in aqueous solution III: Supplemental values.
J. Pharm. Sci. 64, 1884-1886

Schäfer, G., Schatz, H. (1981):
Long-term effects of leucine and arginine on ß-cell function of cultivated pancreatic rat islets.
J. Endocr. 91, 255-262

Schofield, J.(1971):
Effect of sulfhydryl reagents on the release of ox growth hormone in vitro.
Biochim. Biophys. Acta 252, 516-526

Semerdjian, R., et al. (1967):
Acute changes in airway resistance as an index of drug effects-results with N-acetylcysteine.
Clin. Res. 15, 434

Sener, A., Hutton, J. C. Kawazu, S., Boschero, A. C., Somers, G., Devis, G., Herchuelz, A., Malaisse, W. J. (1978 a):
The stimulus-secretion coupling of glucose-induced insulin release. Metabolic and functional effects of NH_4^+ in rat islets.
J. Clin. Invest. 62, 868-878

Sener, A., Kawazu, S., Hutton, J. C., Boschero, A. C., Devis, G., Somers, G., Herchuelz, A., Malaisse, W. J. (1978 b):
The stimulus-secretion coupling of glucose-induced insulin release. Effect of exogenous pyruvate upon islet function.
Biochem. J. 176, 217-232

Sheffner, A. L. (1965):
Mucolytic activity, mechanism of action and metabolism of acetylcysteine.
Pharmacotherapeutica 1, 47

Sheffner, A. L., Medler, E. M., Bailey, K. R., Gallo, D. G., Mueller, A. J. Sarett, H. P. (1966):
Metabolic studies with acetylcysteine.
Biochemical Pharmacology 15, 1523-1535

Shenfield, G. M., Oh, T. E. (1980):
Intravenous N-acetylcysteine for paracetamol poisoning.
Chim. Exper. Pharmacol. Physiol. 7, 671

Slansky, H. H., et al. (1970):
Cysteine and acetylcysteine in the prevention of corneal ulcerations.
Ann. Ophthal. 2, 488-491

Slavik, M., Saiers, J. H. (1982):
Phase I clinical study of acetylcysteine protecting effect on ifosfamide-induced hematuria.
ASCO Abstracts 27, Nr. C-109

Stamm, S. J., Docter, J. (1965):
Clinical evaluation of acetylcysteine as a mucolytic agent in cystic fibrosis.
Dis. Chest. 47, 414

Sugden, M. C., Ashcroft, S. J. H. (1978):
Effects of phosphoenolpyruvate, other glycolytic intermediates and methylxanthines on calcium uptake by a mitochondrial fraction from rat pancreatic islets.
Diabetologia 15, 173-180

Sussman, K., Vaughan, G., Stjernholm, M. (1967).
Factors controlling insulin secretion in the perfused isolated rat pancreas.
Diabetes, Proc. 6th Congr. Int. Diabetes Fed. Stockholm, I. C. S. No. 172, 123-137

Thomas, P. A., et al. (1966):
Prevention of postoperative pulmonary atelectasis. Review of 215 cases and evaluation of acetylcysteine.
Am. Surg. 32, 301

Thomas, P. A., et al. (1967):
Incidence of contralateral pulmonary atelectasis after thoracotomy: An evaluation of preventive aftercare.
Dis. Chest. 51, 288

Thor, H., Moldeus, P., Orrenius, S. (1979):
Metabolic activation and hepatotoxicty.
Archives of Biochemistry and Biophysics 192, 405-413

Vale, J. A., Wheeler, D. C. (1982):
Anaphylactoid reactions to acetylcysteine.
Lancet 2, 988

Veech, R. L., Eggleston, L. V., Krebs. H. A. (1969):
The redox state of free nicotinamide-adenine dinucleotide phosphate in the cytoplasm of rat liver.
Biochem. J. 115, 609-619

Verspohl, E. J., Händel, M., Ammon H. P. T. (1979):
Pentose phosphate shunt activity of rat pancreatic islets: Its dependence on glucose concentration.
Endocrinology 105, 1269-1274

Verspohl, E. J., Hagenloh, J., Händel, M., Grether, A. (1981):
In vitro inhibition of glucose- leucine- arginine- and tolbutamide-induced insulin secretion by exogenous insulin.
Abstr. 183, Naunyn Schmiedebergs Arch. of Pharmacol., Suppl. to Vol. 316

Wactemath, C. L., Bergman, N. A. (1973):
Increased respiratory resistance provoked by endotracheal administration of aerosols.
Am. Rev. Resp. Dis. 108, 520

Walton, N. G., Mann, T. A. N,, Shaw, K. M. (1979):
Anaphylactoid reaction to N-acetylcysteine.
Lancet 2, 1298

Watkins, D., Cooperstein, S. J., Lazarow, A. (1971):
Effect of sulfhydryl-binding reagents on islet tissue permeability: Protection and reversal by thiol compounds.
J. Pharmacol. Exp. Ther. 176, 42-51

Watkins, D. T., Moore, M. (1974):
Effect of sulfhydryl-binding reagents on insulin release from isolated secretion granules.
Endocrinology 95, 485-491

LEBENSLAUF

Rainer Friedrich Brackertz
geboren am 18. September 1954 in Berlin-Tempelhof

Vater: Dr. phil. Karl Brackertz, Oberstudiendirektor i.R.
Mutter: Beate Brackertz, geb. Schreur

1961-1962 Besuch der Bonhoeffer-Grundschule in Berlin-Charlottenburg, 1962-1968 Schulausbildung an der Deutschen Schule Barcelona (Spanien), anschließend an der Erich-Hoepner-Oberschule (altsprachliches Gymnasium) in Berlin-Charlottenburg. 1971 Erwerb des Lehrerdiploms für das Fach Spanisch an der Universität Zaragoza (Spanien). Januar 1973 Abitur an der Erich-Hoepner-Oberschule. April 1973 Aufnahme des Pharmaziestudiums an der Freien Universität Berlin. Erster Abschnitt der Pharmazeutischen Prüfung im Februar/März 1975, Zweiter Abschnitt der Pharmazeutischen Prüfung im Februar/März 1977. Dritter Ausbildungsabschnitt (Praktisches Jahr) in der Apotheke im Klinikum Westend der Freien Universität Berlin (April bis September 1977) und in der Gertruden-Apotheke in Berlin-Lichterfelde (Oktober 1977 bis März 1978). Approbation als Apotheker im April 1978. Von April bis Juli 1978 Mitarbeiter der Apotheke im Klinikum Westend der FU Berlin, anschließend Tätigkeit in der Greif-Apotheke in Berlin-Steglitz. Von November 1978 bis Juni 1979 Mitarbeiter der Apotheke im Rudolf-Virchow-Krankenhaus in Berlin-Wedding. Seit Juli 1979 Mitarbeiter der Apotheke im Klinikum der Universität Tübingen (Universitätsapotheke). Arbeitsgebiete: Arzneimittel-Dokumentation und -Information, Fragen der Arzneimittelverteilung im Krankenhaus, Bau und

Einrichtung von Krankenhausapotheken. Mitglied der Arbeitsgemeinschaft Deutscher Krankenhausapotheker (ADKA) und der Asociación Española de Farmacéuticos de Hospitales (AEFH). Seit 1979 Mitglied der Europäischen Gesellschaft für Klinische Pharmazie (ESCP), seit 1983 Vorstandsmitglied.

Beginn der Arbeiten zur vorliegenden Dissertation im Januar 1981 am Lehrstuhl für Pharmakologie am Pharmazeutischen Institut der Universität Tübingen bei Herrn Prof. Dr. H.P.T. Ammon. Abschluß der experimentellen Arbeiten zur Dissertation im Oktober 1983.

Meine akademischen Lehrer außer Herrn Prof. Dr. H.P.T. Ammon waren die Herren Professoren
H. Kreutzberger, H. Möhrle (Pharmazeutische Chemie);
K.H. Frömming (Pharmazeutische Technologie);
H. Rimpler, R. Hänsel (Pharmazeutische Biologie);
F. v. Bruchhausen, E. Oberdisse (Pharmakologie);
K. Großgebauer (Medizinische Mikrobiologie).